

**Biologische und methodische Aspekte
des komplexen RhoA-Signalnetzwerkes:

Sein Einfluss auf
die HGF-Reaktion von A549-Zellen
und
einen FRET-basierten RhoA-Aktivitäts-Biosensor**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Vera Schwarz
aus Iserlohn

Februar 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden in der Abteilung Molekulare Zellbiologie der Universität Duisburg-Essen sowie in der Abteilung Systemische Zellbiologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Perihan Nalbant

2. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Gunzer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XIII
Zusammenfassung	1
Summary	2
1 Einleitung	3
1.1 Die Rho-GTPase RhoA	5
1.1.1 Wichtige RhoA-Signalwege	5
1.1.2 Regulation von RhoA	8
1.1.2.1 GEFs	9
1.1.2.2 GAPs	9
1.1.2.3 Das RhoA/Rac1-GAP p190A: Wechselwirkung zwischen RhoA- und Rac1- und Ras-Signalwegen	10
1.1.2.4 Posttranslationale Modifikationen	13
1.1.2.5 RhoGDI	14
1.1.2.6 Degradation	15
1.2 Methoden zur Untersuchung der Funktion und Aktivität von RhoA	16
1.2.1 Konstitutiv aktive und dominant negative Mutationen	16
1.2.2 Coimmunpräzipitationen und Aktivitäts-Pulldowns	18
1.2.3 Intrazelluläre RhoA-Aktivitäts-Biosensoren	18
1.3 Zielsetzung der Arbeit	23
2 Material	24
2.1 Zelllinien	24
2.2 <i>E. coli</i> -Stämme	24
2.3 Plasmid-DNAs	24
2.4 Oligonukleotide	26
2.4.1 siRNAs	26
2.4.2 DNA-Oligomere zur Klonierung	27
2.4.3 DNA-Oligomere zur Mutagenese	28
2.4.4 DNA-Oligomere für qPCR	29
2.4.5 DNA-Oligomere zur Sequenzierung	29

2.5	Puffer, Lösungen und Medien	29
2.5.1	Puffer für Arbeiten mit DNA	30
2.5.2	Medien für mikrobiologische Arbeiten	30
2.5.3	Puffer, Lösungen und Medien für zellbiologische Arbeiten	31
2.5.4	Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
2.5.5	Puffer und Lösungen für Western Blots	32
2.5.6	zusätzliche Puffer und Lösungen zur Beschichtung von Sepharose und für RhoA-Aktivitäts-Pulldowns	33
2.6	Chemikalien	35
2.7	Reagenziensätze	37
2.8	Protein- und Nukleinsäure-Standards	37
2.9	Antikörper	38
2.10	Enzyme und Proteine	38
2.11	Verbrauchsmaterial	38
2.12	Geräte	40
2.13	Mikroskope	41
2.14	Softwares	43
3	Methoden	44
3.1	Arbeiten zur Generierung/Modifikation von DNA-Konstrukten	44
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	44
3.1.2	Anfügen von 3'-Adenin-Überhängen an DNA-Fragmente	45
3.1.3	mutagene Polymerase-Kettenreaktion	46
3.1.4	Restriktionsverdau	47
3.1.4.1	Analytischer Restriktionsverdau	48
3.1.4.2	Präparativer Restriktionsverdau	48
3.1.4.3	Restriktionsverdau im Rahmen der Mutagenese	49
3.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	49
3.1.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	50
3.1.7	Ligation	50
3.1.8	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	51
3.1.9	TOPO-Klonierung	52
3.1.10	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	53
3.2	Biochemische Arbeiten	53
3.2.1	Gewinnung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen	53

3.2.2	Messung der Proteinkonzentration_____	54
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese_____	54
3.2.4	Western Blot_____	55
3.2.5	Immundetektion_____	56
3.2.6	Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen_____	57
3.2.7	cDNA-Synthese_____	57
3.2.8	quantitative Echtzeit-PCR_____	58
3.2.9	RhoA-Aktivitäts-Pulldown_____	62
3.2.10	Beschichtung von Glutathion-Sepharose mit GST-RBD-Fusionsprotein_____	64
3.3	Zellbiologische Arbeiten_____	66
3.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen_____	66
3.3.2	HGF-Behandlung_____	67
3.3.2.1	HGF-Behandlung von A549-Zellen_____	67
3.3.2.2	HGF-Behandlung von MDCK-Zellen_____	67
3.3.3	Transfektion von MDCK-Zellen mit Plasmid-DNA_____	68
3.3.4	Transfektion von A549-Zellen mit siRNA_____	69
3.4	Mikroskopie_____	70
3.4.1	Phasenkontrast-Mikroskopie lebender, HGF-stimulierter A549-Zellen_____	70
3.4.2	konfokale Laser-Raster-Fluoreszenz-Mikroskopie lebender, RhoA Biosensor-exprimierender Zellen_____	70
3.4.3	konfokale Laser-Raster-Mikroskopie an Fluorophor-Lösungen_____	72
3.4.4	Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie_____	74
3.4.5	Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie des RhoA-Biosensors_____	75
3.5	Auswertung von Bilddaten_____	76
3.5.1	ImageJ_____	76
3.5.1.1	Analyse von Phasenkontrast-Zeitraffer-Mikroskopie-Aufnahmen_____	76
3.5.1.1.1	Bewegungs-Analyse_____	76
3.5.1.1.2	Zelldichte-Analyse_____	77
3.5.1.2	Analyse von RhoA-Biosensor-Bildern vom Laser-Raster Fluoreszenz-Mikroskop_____	79
3.5.2	IgorPro_____	81
4	Ergebnisse_____	82
4.1	Die Bedeutung von RhoA-Signalwegen in der HGF-Reaktion von A549-Zellen_____	82
4.1.1	Optimierung der Makros für die Bildauswertung_____	82

4.1.1.1	Optimierung der Variablen des Zelldichte-Makros	82
4.1.1.2	Das Zelldichte-Makro ist gegenüber der Helligkeit der analysierten Bilder robust	84
4.1.1.3	Optimierung des Schwellenfaktors des Bewegungs-Makros	85
4.1.2	RhoA wird in A549-Zellen HGF-abhängig transient reguliert	87
4.1.3	Rolle des RhoA-GAPs p190A in der HGF-Reaktion von A549-Zellen	88
4.1.3.1	Test verschiedener siRNAs zur Depletion von p190A	88
4.1.3.2	Die Stärke der Reaktion von A549-Zellen auf HGF wird durch p190A-Depletion nicht beeinflusst	91
4.1.3.3	RhoA-Aktivitäts-Pulldowns p190A-depletierter A549-Zellen liefern einen Hinweis darauf, dass p190A an der HGF-abhängigen Regulation von RhoA beteiligt sein könnte	93
4.1.4	Die Bewegung HGF-stimulierter A549-Zellen nach RhoA-Depletion	96
4.2	Charakterisierung des RhoA-Biosensors	98
4.2.1	Vergleich zweier Methoden zur Verbesserung des SNR in mikroskopischen Bilddaten	99
4.2.1.1	Manuelle Messung der Rausch-Kenngrößen des verwendeten konfokalen Laser-Raster-Mikroskops bei verschiedenen Einstellungen	99
4.2.1.2	Effekte von Gauss-Filter und PureDenoise auf die Ergebnisse der Bildanalyse	101
4.2.1.2.1	Nicht für jede Rausch-Kenngröße stimmten die automatisch von PureDenoise abgeschätzten und manuell gemessenen Werte gut überein	101
4.2.1.2.2	Typisches Erscheinungsbild der Quotientenbilder RhoA-Biosensor-exprimierender MDCK-Zellen	103
4.2.1.2.3	Moderate SNR-Verbesserung beeinflusste zwar kaum die Helligkeit der Rohdaten, aber dennoch die der Quotientenbilder	106
4.2.1.2.4	Die Histogrammbreite eines Quotientenbildes war von der Helligkeit der Rohdaten abhängig; SNR-Verbesserung verringerte diese Abhängigkeit	108
4.2.1.2.5	Detaillierter Vergleich der SNR-Verbesserung mit PureDenoise und Gauss-Filter mit Radius 1 Pixel: Die resultierenden Quotientenbilder unterschieden sich hauptsächlich an den Zellrändern	112
4.2.2	Mechanistische Untersuchungen am RhoA-Biosensor	114
4.2.2.1	Die mittlere Helligkeit von FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors variierte stark zwischen einzelnen Zellen	114

4.2.2.2 Die Signalverteilungen in FRET/YFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors waren nahezu homogen, die in YFP/CFP-Quotientenbildern dagegen nicht	116
4.2.2.3 FLIM-Messungen am RhoA-Biosensor zeigten insgesamt viel FRET, jedoch wenig differentiellen FRET	118
4.2.2.4 Der Raichu-RhoA-Biosensor lieferte ähnliche Ergebnisse wie der normale RhoA-Biosensor	121
4.2.2.5 Die Quotientenbilder trunkierter RhoA-Biosensor-Konstrukte zeigten nahezu homogenes Signal	122
4.2.2.6 Die Quotientenbilder des konstitutiv aktiven, des konstitutiv Inaktiven und des funktionellen RhoA-Biosensors zeigten die gleichen Signalverteilungen, aber unterschiedliche Helligkeiten	125
4.2.2.7 Trunkierung der RBD wirkte auf den T19N-Biosensor anders als auf die WT- und Q63L-Biosensoren	127
4.2.2.8 RhoA-Biosensor-Pulldowns belegten die erhöhte Aktivität des Q63L-Biosensors und die intramolekulare Bindung an RBD	129
4.2.2.9 Systematische Signalverteilungen in FRET/CFP-Quotientenbildern wurden nicht durch intrazellulär unterschiedliche ATP-Konzentrationen verursacht	131
4.2.2.10 Mutationen der Phosphorylierungsstelle im Biosensor-RhoA bewirkten keine messbare Änderung der ratiometrischen Ergebnisse	133
4.2.2.11 Die Mutation R68E im Biosensor-RhoA bewirkte keine signifikante Änderung der ratiometrischen Ergebnisse	134
4.2.2.12 In Δ RBD-Biosensor-Konstrukten bewirkte die Verringerung der RhoGDI-Interaktion verstärkte Membranlokalisierung	135
4.2.2.13 Die Membranbindung des RhoA-Biosensors ruft die Heterogenitäten in den FRET-CFP-Quotientenbildern hervor und beeinflusst deren Helligkeit	138
4.2.2.14 Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie zeigte Unterschiede in der Verteilung der Membranlokalisation verschiedener RhoA-Biosensor-Konstrukte	141
5 Diskussion	144
5.1 Die Bedeutung von RhoA-Signalwegen in der HGF-Reaktion von A549-Zellen	144
5.1.1 Sowohl die Aktivität als auch die Gesamt-Menge von RhoA werden HGF-abhängig reguliert	144
5.1.2 RhoA-Aktivitäts-Pulldowns deuten darauf hin, dass p190A an der HGF-abhängigen Regulation von RhoA beteiligt sein könnte	145

5.1.3	Die automatisierte Bildauswertung ist leistungsfähig genug zur Detektion von leichten Bewegungs-Phänotypen	147
5.1.4	Die Stärke der HGF-Reaktion wird durch die experimentell erreichte p190A-Depletion nicht beeinflusst	148
5.1.5	Die beiden RhoA-depletierenden siRNAs zeigten entgegengesetzte Effekte auf die Bewegung von A549-Zellen	149
5.1.6	Fazit: Weiterführende Untersuchungen sollten vor allem die Rolle der Degradation von RhoA in der HGF-Reaktion von A549-Zellen aufklären	150
5.2	Charakterisierung des RhoA-Biosensors	151
5.2.1	Vergleich von PureDenoise-Makro und Gauss-Filter zur Verbesserung des SNR in mikroskopischen Bilddaten	151
5.2.1.1	Die Leistungsfähigkeit des PureDenoise-Makros beim Abschätzen der Rausch-Kenngrößen	152
5.2.1.2	PureDenoise ist dem Gauss-Filter in seinen Auswirkungen auf die Helligkeit von Rohdaten- und Quotientenbildern überlegen	153
5.2.1.3	Der Skalierungsfaktor eines Quotientenbildes ist von der Helligkeit der Rohdaten abhängig; SNR-Verbesserung verringert diese Abhängigkeit	154
5.2.1.4	Fazit: Angemessene SNR-Verbesserung ist mit dem PureDenoise-Makro einfacher zu erzielen als mit einem Gauss-Filter	155
5.2.2	Mechanistische Untersuchungen am RhoA-Biosensor	157
5.2.2.1	Untersuchungen zur Überprüfung des postulierten RhoA-Biosensor-Mechanismus	157
5.2.2.1.1	Differentieller FRET ist nicht der Mechanismus des RhoA-Biosensors	158
5.2.2.1.2	Die Biosensor-RBD ist notwendig für die systematischen Signalverteilungen in den FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors	160
5.2.2.1.3	Die Signalverteilung in FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors wird nicht unmittelbar durch den RhoA-Aktivitätsstatus bestimmt	160
5.2.2.1.4	Der T19N-Biosensor ist als Negativkontrolle für den RhoA-Biosensor ungeeignet	161
5.2.2.2	Untersuchungen zur Überprüfung alternativer Einflüsse auf den RhoA-Biosensor	163
5.2.2.2.1	Die FRET/CFP-Quotientenbilder des RhoA-Biosensors werden nicht durch intrazelluläre Variationen der ATP-Konzentration beeinflusst	163

5.2.2.2.2 Die Biosensor-RBD schützt den RhoA-Biosensor vor Extraktion aus der Plasmamembran durch RhoGDI und verhindert die übermäßige Beeinträchtigung endogener Signalprozesse_____	164
5.2.2.2.3 Die Q63L-Mutation im RhoA-Biosensor beeinflusst seine Membranbindung_____	166
5.2.2.2.4 Die Membranbindung beeinflusst die Fluoreszenz von CFP und/oder YFP im RhoA-Biosensor_____	167
5.2.2.3 Fazit: Der FRET-basierte RhoA-Biosensor bietet nur geringe Vorteile gegenüber Translokations-RhoA-Biosensoren_____	169
Literaturverzeichnis_____	172
Anhang_____	186
Danksagung_____	198
Lebenslauf_____	199

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Regulation der Nukleotid-Bindung an Rho-GTPasen durch GEFs, GAPs und RhoGDI	4
Abbildung 1.2: Überlagerte Strukturen von GTP- und GDP-gebundenem RhoA	5
Abbildung 1.3: Domänenstruktur von p190A	11
Abbildung 1.4: Verschiedene RhoGTPase-Biosensor-Designs	19
Abbildung 3.1: Exemplarische Auftragung zur Feststellung einer maximalen Amplifikations-Effizienz eines qPCR-Primerpaares	61
Abbildung 4.1: Optimierung des Zelldichte-Makros für die Phasenkontrast-Zeitraffer-Filme	83
Abbildung 4.2: Das Zelldichte-Makro ist gegenüber der Helligkeit der zu analysierenden Bilder unempfindlich	85
Abbildung 4.3: Ein optimaler Schwellenfaktor im Bewegungs-Makro liefert Ergebnisse, die sich für unterschiedliche Auftragsarten eignen	86
Abbildung 4.4: Ergebnisse der RhoA-Aktivitäts-Pulldowns an HGF-stimulierten A549-Zellen	88
Abbildung 4.5: p190A-Depletion mit fünf verschiedenen Einzel-siRNAs	89
Abbildung 4.6: p190A-Depletion mit siGRLF#1, #4 und deren Mischung	91
Abbildung 4.7: Die Stärke der HGF-Reaktion von A549-Zellen wird durch p190A-Depletion nicht beeinflusst	92
Abbildung 4.8: Ergebnisse der RhoA-Aktivitäts-Pulldowns an p190A-depletierten, HGF-stimulierten A549-Zellen	95
Abbildung 4.9: Bewegung HGF-stimulierter A549-Zellen nach RhoA-Depletion	96
Abbildung 4.10: Signal-Varianzen in Bildern, die an Fluorophor-Lösungen aufgezeichnet wurden	100
Abbildung 4.11: Vergleich automatisch und manuell gemessener Rausch-Kenngrößen des verwendeten konfokalen Laser-Raster-Mikroskops	102
Abbildung 4.12: Repräsentative RhoA-Biosensor-exprimierende MDCK-Zelle nach HGF-Behandlung	104
Abbildung 4.13: Repräsentative Zellen für jede der vier Populationen in dem Experiment	105
Abbildung 4.14: Helligkeiten von CFP-Bildern sowie FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern in Abhängigkeit von der verwendeten SNR-Verbesserung	107
Abbildung 4.15: Individuelle Skalierungsfaktoren von FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern	108
Abbildung 4.16: Einfluss unterschiedlicher Methoden der SNR-Verbesserung auf FRET/CFP-Skalierungsfaktoren	109

Abbildung 4.17: Individuelle Skalierungsfaktoren von FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern	110
Abbildung 4.18: Normalisierte Skalierungsfaktoren der Quotientenbilder von MDCK-Zellen, die RhoA-Biosensor-Konstrukte unter verschiedenen Bedingungen exprimieren	111
Abbildung 4.19: Vergleich von FRET/CFP-Quotientenbildern, die nach verschiedenen Methoden der SNR-Verbesserung berechnet wurden	113
Abbildung 4.20: Mittlere Helligkeiten von FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors	115
Abbildung 4.21: Die verschiedenen Quotientenbilder einer lebenden MDCK-Zelle, die den RhoA-Biosensor exprimiert: Typisches Aussehen und Größe der Skalierungsfaktoren	117
Abbildung 4.22: RhoA-Biosensor-Konstrukte zeigten insgesamt viel FRET, jedoch wenig differentiellen FRET	119
Abbildung 4.23: Typisches Aussehen der verschiedenen Quotientenbilder einer lebenden MDCK-Zelle, die den Raichu-RhoA-Biosensor exprimiert	122
Abbildung 4.24: Veränderung der Quotientenbilder des RhoA-Biosensors durch Trunkierung: Erscheinungsbild und Helligkeit	124
Abbildung 4.25: Quotientenbilder des RhoA-Biosensors mit konstitutiv aktivem und konstitutiv inaktivem RhoA: Erscheinungsbild und Helligkeit	126
Abbildung 4.26: RBD-trunkierte Varianten des konstitutiv aktiven und konstitutiv inaktiven RhoA-Biosensors: Erscheinungsbild und Helligkeit der Quotientenbilder	128
Abbildung 4.27: Ergebnisse der RhoA-Biosensor-Pulldowns	130
Abbildung 4.28: FRET/Donor-Quotientenbilder cerulean-tragender Biosensoren sind dunkler als die ihrer CFP-tragenden Gegenstücke	132
Abbildung 4.29: Die Mutation der Phosphorylierungsstelle am RhoA des Biosensors hatte keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder	134
Abbildung 4.30: Die R68E-Mutation des Biosensor-RhoAs hatte keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder	135
Abbildung 4.31: Die R68E-Mutation hatte in Δ RBD-Biosensor-Konstrukten zwar keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder, verstärkte aber die Membranbindung	137
Abbildung 4.32: Die Trunkierung der CAAX-Box im RhoA-Biosensor beeinflusst sowohl das Erscheinungsbild, als auch die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder	139
Abbildung 4.33: Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie zeigt, dass verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte bei der Membranbindung unterschiedlich stark dynamische Membranausstülpungen bevorzugen	142
Abbildung A.1: Effekte von Rauschen in Bilddaten auf das Ergebnis ratiometrischer Auswertung	186

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien	24
Tabelle 2.2: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	24
Tabelle 2.3: Verwendete Plasmid-DNAs	24
Tabelle 2.4: Verwendete siRNAs	26
Tabelle 2.5: Zur Klonierung verwendete DNA-Oligomere	27
Tabelle 2.6: Zur Mutagenese verwendete DNA-Oligomere	28
Tabelle 2.7: Zur qPCR verwendete DNA-Oligomere	29
Tabelle 2.8: Zur Sequenzierung verwendete DNA-Oligomere	29
Tabelle 2.9: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer für Arbeiten mit DNA	30
Tabelle 2.10: Zusammensetzungen der verwendeten Medien für mikrobiologische Arbeiten	30
Tabelle 2.11: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien für zellbiologische Arbeiten	31
Tabelle 2.12: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
Tabelle 2.13: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen für Western Blots	32
Tabelle 2.14: Zusammensetzungen der verwendeten zusätzlichen Puffer und Lösungen zur Beschichtung von Sepharose und für RhoA-Aktivitäts-Pulldowns	33
Tabelle 2.15: Verwendete Chemikalien	35
Tabelle 2.16: Verwendete Reagenziensätze	37
Tabelle 2.17: Verwendete Protein- und Nukleinsäure-Standards	37
Tabelle 2.18: Verwendete Antikörper	38
Tabelle 2.19: Verwendete Enzyme und Proteine	38
Tabelle 2.20: Verwendete Verbrauchsmaterialien	38
Tabelle 2.21: Verwendete Geräte	40
Tabelle 2.22: Nikon-System für Phasenkontrast-Aufnahmen	41
Tabelle 2.23: Leica-System für konfokale Laser-Raster-Fluoreszenz-Aufnahmen	42
Tabelle 2.24: Nikon-System für Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Aufnahmen	42
Tabelle 2.25: Olympus/PicoQuant-System für Fluoreszenz-Lebensdauer-Aufnahmen	43
Tabelle 2.26: Genutzte Softwares	43
Tabelle 3.1a: Typische Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes	45
Tabelle 3.1b: Typischer Temperaturverlauf einer PCR	45

Tabelle 3.2: Typische Zusammensetzung einer Reaktion zum Anfügen von 3'-Adenin-Überhängen	46
Tabelle 3.3a: Typische Zusammensetzung eines mutagenen PCR-Ansatzes	47
Tabelle 3.3b: Typischer Temperaturverlauf einer mutagenen PCR	47
Tabelle 3.4a: Typischer Ansatz eines analytischen Restriktionsverdau	48
Tabelle 3.4b: Typischer Ansatz eines präparativen Restriktionsverdau	48
Tabelle 3.5: Typische Zusammensetzung eines Ligationsansatzes	51
Tabelle 3.6: Zusammensetzung eines TOPO-Ligationsansatzes	52
Tabelle 3.7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele	55
Tabelle 3.8: Typische Zusammensetzung und Temperaturführung einer cDNA-Synthese	58
Tabelle 3.9a: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes	59
Tabelle 3.9b: Temperaturverlauf einer qPCR	60
Tabelle 3.10: Bei der Subkultivierung umgesetzte Zellzahlen	67
Tabelle 3.11: Zusammensetzung von Plasmid-DNA-Transfektionsansätzen	68
Tabelle 3.12: Zusammensetzung von siRNA-Transfektionsansätzen	69
Tabelle 4.1: Rausch-Kenngrößen incl. Standardabweichung für verschiedene Mikroskop-Einstellungen	100
Tabelle A.1: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten RhoA-Biosensor-Konstrukte	187
Tabelle A.2: Optimierung des Zelldichte-Makros für die Phasenkontrast-Zeitraffer-Filme	189
Tabelle A.3: Ergebnisse der RhoA-Aktivitäts-Pulldowns an HGF-stimulierten A549-Zellen	189
Tabelle A.4: p190A-Depletion mit fünf verschiedenen Einzel-siRNAs	190
Tabelle A.5: p190A-Depletion mit siGRLF1#1, #4 und deren Mischung	190
Tabelle A.6: Nachweis der p190A-Depletion zum RhoA-Aktivitäts-Pulldown auf Proteinebene	190
Tabelle A.7: Ergebnisse der RhoA-Aktivitäts-Pulldowns an p190A-depletierten, HGF-stimulierten A549-Zellen	191
Tabelle A.8: RhoA-Depletion, α Tubulin- und Gesamt-Proteingehalt in nt-siRNA-, siRhoA#6+8-, siRhoA#6- und siRhoA#8-transfizierten A549-Zellen	191
Tabelle A.9: Automatisch abgeschätzte Rausch-Kenngrößen incl. Standardabweichungen des verwendeten konfokalen Laser-Raster-Mikroskops	192
Tabelle A.10: Helligkeiten von CFP-Bildern sowie FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern in Abhängigkeit von der verwendeten SNR-Verbesserung	192
Tabelle A.11: Normalisierte Skalierungsfaktoren der Quotientenbilder von MDCK-Zellen, die RhoA-Biosensor-Konstrukte unter verschiedenen Bedingungen exprimieren	192

Tabelle A.12: Mittlere Helligkeiten von FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors	193
Tabelle A.13: Skalierungsfaktoren der verschiedenen Quotientenbilder einer lebenden MDCK-Zelle, die den RhoA-Biosensor exprimiert	193
Tabelle A.14: RhoA-Biosensor-Konstrukte zeigten viel FRET	193
Tabelle A.15: Veränderung der Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder des RhoA-Biosensors durch Trunkierung	194
Tabelle A.16: Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder des RhoA-Biosensors mit konstitutiv aktivem und konstitutiv inaktivem RhoA	194
Tabelle A.17: Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder RBD-trunkierter Varianten des konstitutiv aktiven und konstitutiv inaktiven RhoA-Biosensors	194
Tabelle A.18: Ergebnisse der RhoA-Biosensor-Pulldowns	195
Tabelle A.19: FRET/Donor-Quotientenbilder cerulean-tragender Biosensoren sind dunkler als die ihrer CFP-tragenden Gegenstücke	195
Tabelle A.20: Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder von RhoA-Biosensor-Konstrukten mit mutierten RhoA-Phosphorylierungsstelle	195
Tabelle A.21: Die R68E-Mutation des Biosensor-RhoAs hatte keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder	196
Tabelle A.22: Die R68E-Mutation hatte in Δ RBD-Biosensor-Konstrukten keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder	196
Tabelle A.23: Die Trunkierung der CAAX-Box im RhoA-Biosensor beeinflusst die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder	196
Tabelle A.24: Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie zeigt, dass verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte bei der Membranbindung unterschiedlich stark dynamische Membranausstülpungen bevorzugen	197

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. victoria</i>	<i>Aequorea victoria</i>
AOBS	akusto-optischer Strahlteiler, <i>acousto-optical beam splitter</i>
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serum-Albium, <i>beef serum albumin</i>
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
CFP	<u>c</u> yan <u>f</u> luoreszierendes <u>P</u> rotein
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> id
DMF	<u>D</u> imethyl <u>f</u> ormamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	<u>D</u> esoxyribonukle <u>a</u> se
dNTP	<u>D</u> esoxyribonukle <u>i</u> ntriphosphat
dT	<u>D</u> esoxythymidin
DTE	<u>D</u> ithio <u>e</u> rythrit
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM	extrazelluläre Matrix, <i>extracellular matrix</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor, <i>epidermal growth factor</i>
EMT	epitheliale- <u>m</u> esenchymale <u>T</u> ransition
FAK	<u>F</u> okal <u>a</u> dhäsions- <u>K</u> inase
FBS	fötales Rinderserum, <i>fetal beef serum</i>
FLIM	Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie, <i>fluorescence lifetime microscopy</i>
FRET	<u>F</u> luoreszenz- <u>R</u> esonanz <u>e</u> nergietransfer
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	<u>G</u> TPase- <u>a</u> ktivierendes <u>P</u> rotein
GAPDH	<u>G</u> lycer <u>a</u> ldehyd-3- <u>P</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase
GBD	<u>G</u> TPase- <u>b</u> indende <u>D</u> omäne
GDP	<u>G</u> uanosin <u>d</u> iphosphat
GEF	Guaninnukleotid-austauschendes Protein, <i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	grün <u>f</u> luoreszierendes <u>P</u> rotein

GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
GTP	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
GTPase	<u>G</u> TP- <u>H</u> ydrolase
HEPES	2-(4-(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1-piperaziny <u>l</u>)-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyten-Wachstumsfaktor, <i>hepatocyte growth factor</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, <i>horseradish peroxidase</i>
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LPA	Lysophosphatidylsäure, <i>lysophosphatidic acid</i>
MLC	leichte Myosin-Kette, <i>myosin light chain</i>
OD	optische <u>D</u> ichte
PAK1	p21-aktivierte <u>K</u> inase <u>1</u>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PFS	selbsterhaltendes Fokussystem, <i>perfect focus system</i>
PKC	<u>P</u> rotein- <u>K</u> inase <u>C</u>
PMT	Photoelektronenvervielfacher, <i>photomultiplier tube</i>
PVDF	<u>P</u> olyvinyliden <u>f</u> luorid
qPCR	quantitative Echtzeit- <u>P</u> CR
RBD	<u>R</u> ho- <u>B</u> indedomäne
RhoGDI	<u>R</u> ho- <u>G</u> uaninnukleotid- <u>D</u> issoziations- <u>I</u> nhibitor
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
ROCK	<u>R</u> ho-abhängige coiled-coil- <u>K</u> inase
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<u>S</u> DS- <u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> elelektrophorese
siRNA	kleine interferierende RNA, <i>small interfering RNA</i>
SNR	Signal-zu-Rauschen-Verhältnis, <i>signal-to-noise ratio</i>
SPAD	Einzelphotonen-Lawinendiode, <i>single photon avalanche diode</i>
SRF	<u>S</u> erum- <u>R</u> esponse- <u>F</u> aktor
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethylenethylen <u>d</u> iamin
TIRF	Interne Totalreflexions-Fluoreszenz, <i>total internal reflection fluorescence</i>
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
WASP	<u>W</u> iscott- <u>A</u> ldrich- <u>S</u> yndrom- <u>P</u> rotein
YFP	gelb fluoreszierendes Protein, <i>yellow fluorescent protein</i>

Zusammenfassung

Die kleine GTPase RhoA ist ein regulatorisches Protein mit zahlreichen Funktionen in der Organisation des Aktin-Cytoskeletts: Induktion von Stressfasern, Stabilisierung von Aktin-Filamenten sowie die Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten sind bekannte Beispiele. Die Ausübung derart diverser Funktionen muss wiederum selbst zeitlich und örtlich präzise koordiniert werden. Dies ist möglich, da RhoA im GTP-gebundenen Zustand aktiv, im GDP-gebundenen Zustand jedoch inaktiv ist: RhoA wird durch zahlreiche Proteine reguliert, die seinen Nukleotid-Bindungszustand direkt verändern oder dies verhindern. Weitere Regulationsmechanismen für RhoA umfassen diverse kovalente Modifikationen, die seine Bindungsaffinitäten ändern oder es sogar für die proteasomale Degradation markieren.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von RhoA in der HGF-induzierten Stimulation von A549-Zellen untersucht. Bewegungsanalysen von Lebendzellaufnahmen zeigten, dass sich weder die RNAi-vermittelte Depletion des RhoA-Inaktivators p190A, noch die von RhoA selbst deutlich auf die HGF-induzierte Bewegung der Zellen auswirken. Biochemische Analysen zeigten, dass RhoA selbst infolge der HGF-Stimulation so reguliert wird, dass die Menge aktiven RhoAs ansteigt, während gleichzeitig die Gesamt-Menge an RhoA sinkt. Die Beobachtung dieser gegensätzlichen Regulation bietet eine Grundlage für zukünftige Studien der bei der RhoA-Regulation wirkenden Kompensationsmechanismen.

Eine andere Fragestellung dieser Arbeit war, inwiefern die intrazelluläre Regulation von RhoA mit modernen, fluoreszenz-basierten Methoden zur Beobachtung der RhoA-Aktivität interferiert. Dies wurde am Beispiel eines genetisch codierten, FRET-basierten RhoA-Aktivitäts-Biosensors untersucht. Analysen zahlreicher Varianten des Biosensors mittels stimulierter Akzeptor-Emission, FLIM- und TIRF-Mikroskopie zeigten, dass das Signal des Biosensors nicht wie ursprünglich publiziert hauptsächlich durch variierende FRET-Effizienz in der Zelle und auch nicht unmittelbar durch den Nukleotid-Beladungszustand des Biosensors bestimmt wird. Stattdessen beeinflusst die Bindung des Biosensors an die Zellmembran seine Fluoreszenz nach einem nicht näher entschlüsselten Mechanismus. Die Ergebnisse legen auch nahe, dass der RhoA-Biosensor für die zellulären Regulationsmechanismen nicht in vollem Umfang zugänglich ist. Insgesamt können die Ergebnisse dieser Arbeit für die Konstruktion und Verwendung von Rho-GTPase-Biosensoren von Nutzen sein: Sie liefern für zukünftige Studien konkrete Anregungen, welche möglichen intrazellulären Einflüsse auf die gemessenen Daten bedacht und überprüft werden sollten.

Summary

The small GTPase RhoA is a regulatory protein with multiple functions concerning the organization of the cytoskeleton. These include induction of stress fibers, stabilization of actin filaments and regulation of cell-cell and cell-matrix contacts. With this diverse range of functions, RhoA itself needs to be precisely regulated in a spatio-temporal manner. This is achieved by the fact that RhoA is active when it is GTP-bound, while its GDP-bound form is inactive: There are a plethora of proteins either directly changing its nucleotide-bound state or preventing the change. Further regulatory mechanisms of RhoA include covalent modifications, which influence its affinity towards other proteins or the plasma membrane or even target it for proteasomal degradation.

Within the framework of this thesis the role of RhoA as well as its regulation in the context of HGF-mediated A549 lung cancer cell motility was investigated. Analysis of movement in time-lapse phase contrast movies showed that neither RNAi-mediated depletion of the RhoA-inactivator p190A nor of RhoA itself markedly influenced the movement of the cells in response to HGF. Biochemical analyses revealed bidirectional regulation of RhoA protein amount and activity levels: While the total amount of RhoA decreased upon stimulation with HGF, RhoA activity increased. This finding of simultaneous, yet oppositional regulation might inspire further research on the detailed mechanism of this process.

The second part of the study addressed the impact of intracellular RhoA regulation on the readout of fluorescent tools to studying RhoA activity. To this end, a genetically encoded, FRET-based RhoA activity biosensor was analyzed in the intracellular context. Stimulated emission, FLIM and TIRF microscopy experiments performed with various versions of the biosensor showed that its readout is not dependent on varying FRET efficiency as was originally published. Furthermore, the readout does not directly reflect the nucleotide binding state of the biosensor. Instead, binding of the biosensor to the plasma membrane influences its readout. The mechanism of this influence could not be further elucidated yet. Additional observations suggest that the RhoA biosensor is less accessible to intracellular regulators than the endogenous RhoA protein. In summary, the findings presented here provide inspiration for the construction and application of Rho GTPase activity biosensors: Future approaches in this field can profit from this thesis by considering the possible influences of the cellular context on the biosensor and including appropriate control measurements.

1 Einleitung

Die Bezeichnung „Rho-GTPase“ leitet sich von ihrer Homologie zu den Ras-GTPasen ab („*Ras-homolog*“); diese Homologie war auch der Grund für die erste Entdeckung eines Rho-Gens (Madaule und Axel, 1985). Die Familie der bekannten Rho-GTPasen umfasst inzwischen allein 20 Proteine im Menschen (Boureaux *et al.*, 2007), ist jedoch auch in Invertebraten, Hefen und Pflanzen vertreten (Madaule und Axel, 1985; Yang und Watson, 1993). Die humanen Rho-GTPasen sind GTP-bindende, zumeist 21 kDa schwere Proteine, deren Funktionen in der Zelle vielfältig sind: Sie regulieren unter anderem Transkription, Zellpolarität, Mitose, Apoptose und Hämatopoese (Hill *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 1995; Nobes und Hall, 1999; Maddox und Burridge, 2003; Gu *et al.*, 2003). Die bestuntersuchten Rho-GTPasen sind RhoA, Rac1 und Cdc42. Am detailliertesten charakterisiert ist ihr Einfluss auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, welches auch für einige der zuvor genannten Prozesse ein wichtiger Faktor ist: Die prominenteste Funktion von RhoA ist die Induktion von Stressfasern und der damit verbundenen Myosin-vermittelten Kontraktilität (Paterson *et al.*, 1990). Rac1 und Cdc42 dagegen vermitteln die Ausbreitung der Zelle: Rac1 induziert die Bildung breiter, flacher Membranausstülpungen, die als Lamellipodien bezeichnet werden (Ridley *et al.*, 1992), wohingegen die von Cdc42 induzierten Membranausstülpungen, die Filopodien, sehr schmal und fingerförmig sind (Nobes und Hall, 1995). Untersuchungen mit Knockout-Mäusen zeigten, dass RhoA, Rac1 und Cdc42 essentiell sind: Für jede dieser GTPasen ist der Knockout schon im frühen Embryonalstadium lethal (Sugihara *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Melendez *et al.*, 2011).

Wie auch die Ras-GTPasen können die Rho-GTPasen sowohl GDP (Guanosindiphosphat), als auch GTP (Guanosintriphosphat) binden. Durch die Bindung von GTP kommt es zu einer Konformationsänderung der Proteine, durch die die Interaktion mit nachgeschalteten Effektoren ermöglicht wird, so dass sie dann aktiv bezüglich ihrer regulatorischen Funktionen in der Zelle sind. Der Nukleotid-Bindungszustand der Rho-GTPasen wird durch eine Vielzahl regulatorischer Proteine kontrolliert, von denen sich die meisten in drei Gruppen einteilen lassen: GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität, wodurch gebundenes GTP zu GDP hydrolysiert und die Rho-GTPase inaktiviert wird in dem Sinne, dass ihre Interaktion mit ihren Effektoren unterbunden wird. GEFs (Guaninnukleotid-austauschende Proteine, *guanine nucleotide exchange factors*) stimulieren die Freisetzung gebundenen GDPs von der Rho-GTPase, die daraufhin wieder GTP binden kann, also aktiviert wird. Die Bindung GDP-tragender Rho-GTPasen an die Regulatoren der dritten

Gruppe, der RhoGDIs (Rho-Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitoren) verhindert die Freisetzung des gebundenen GDPs und somit die Aktivierung der GTPase (Ueda *et al.*, 1990). Es wurde allerdings auch gezeigt, dass RhoGDIs GTP-gebundene Rho-GTPasen vor Interaktion mit Rho-GAPs und somit vor Inaktivierung schützen (Hancock und Hall, 1993). Abbildung 1.1 zeigt schematisch die Regulation der Nukleotid-Bindung an Rho-GTPasen durch GEFs, GAPs und RhoGDIs.

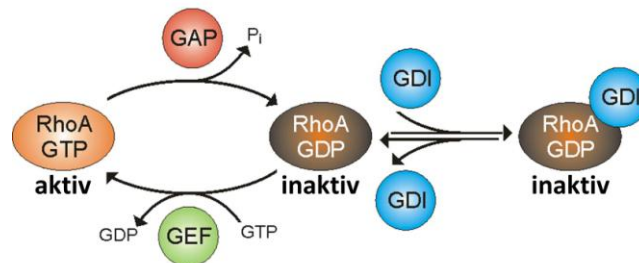


Abbildung 1.1: Regulation der Nukleotid-Bindung an Rho-GTPasen durch GEFs, GAPs und RhoGDI.

Die Zahl der GAPs und GEFs übertrifft die der Rho-GTPasen bei weitem: Im Menschen sind 72 Gene bekannt, die für Rho-GAPs codieren könnten, und weitere 83, die für Rho-GEFs codieren könnten (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). Des Weiteren sind drei verschiedene RhoGDIs bekannt (Ueda *et al.*, 1990; Lelias *et al.*, 1993; Zalzman *et al.*, 1996). Die Spezifität von GAPs, GEFs und RhoGDIs kann unterschiedlich ausgeprägt sein: Einige sind für eine einzelne GTPase spezifisch, andere regulieren mehrere GTPasen. Außerdem werden einige der regulatorischen Proteine – genau wie einige Rho-GTPasen auch – nur in bestimmten Geweben oder als Reaktion auf bestimmte Stimuli exprimiert oder aktiviert. Die Tatsache, dass die Zahl der Rho-Regulatoren die der Rho-GTPasen übersteigt, trägt dem Umstand Rechnung, dass die zahlreichen Funktionen der Rho-GTPasen unabhängig voneinander koordinierbar sein müssen. Die Beobachtung, dass einige der Rho-Regulatoren für mehrere Rho-GTPasen spezifisch sind, liefert bereits einen ersten Anhaltspunkt dafür, dass die Signalwege der Rho-GTPasen einander beeinflussen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die GTPase RhoA. Im Folgenden wird daher zunächst auf die spezifischen Funktionen und Regulation von RhoA eingegangen.

1.1 Die Rho-GTPase RhoA

Das humane RhoA-Protein besteht vor der post-translationalen Modifikation aus 193 Aminosäuren und hat die für eine Rho-GTPase typische Masse von ca. 21 kDa. Es sind keine weiteren Isoformen des Proteins bekannt. Abbildung 1.2 zeigt die überlagerten Strukturen von GTP- und GDP-gebundenem RhoA (verändert nach Hakoshima *et al.*, 2003). Es ist zu erkennen, dass die durch den Nukleotidaustausch induzierte Konformationsänderung hauptsächlich zwei Regionen betrifft, die Switch I- und Switch II-Regionen. Die Switch I-Region wird von den Aminosäuren 28-44 gebildet, die Switch II-Region von den Aminosäuren 62-69 (Ihara *et al.*, 1998). Dies sind die Regionen, welche die Bindung von Effektoren (Maesaki *et al.*, 1999), GEFs (Snyder *et al.*, 2002) und GAPs (Rittinger *et al.*, 1997) vermitteln, sofern der Nukleotid-Bindungszustand und somit die Konformation von RhoA dies erlauben. So wird die Unterscheidung der GTP- und GDP-gebundenen Formen von RhoA ermöglicht. An der Bindung zwischen RhoGDI und RhoA ist die Switch II-Region ebenfalls, die Switch I-Region jedoch in verringertem Maße beteiligt (Longenecker *et al.*, 1999).

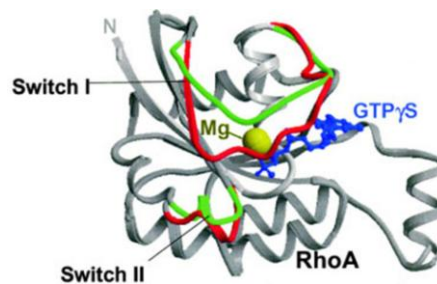


Abbildung 1.2: Überlagerte Strukturen von GTP- und GDP-gebundenem RhoA. Verändert nach Hakoshima *et al.*, 2003. Rot: Switch I- und Switch II-Regionen der GTP-gebundenen Form; grün: Switch I- und Switch II-Regionen der GDP-gebundenen Form.

Einige der zahlreichen Funktionen von RhoA, sowie die Proteine, die an den entsprechenden Signalwegen beteiligt sind, sollen im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

1.1.1 Wichtige RhoA-Signalwege

Die Rho-abhängigen Kinasen ROCK1 und ROCK2 zählen zu den ersten identifizierten RhoA-Effektor-Proteinen. Die RhoA-vermittelten Funktionen von ROCK zählen heute zu den am genauesten charakterisierten Wirkungen von RhoA. Die ROCKs sind ca. 160 kDa schwere Serin/Threonin-Kinasen deren katalytische Aktivität vom N-Terminus ausgeht (Ishizaki *et al.*, 1996; Leung *et al.*, 1995). Die prominenteste Wirkung aktiven RhoAs, die Induktion Aktin-Myosin-abhängiger Kontraktilität, wird durch ROCK vermittelt. Es verstärkt die Interaktion zwischen Myosin und Aktin durch Phosphorylierung der leichten Myosin-

Kette (MLC, *myosin light chain*). Für die Phosphorylierung sind zwei verschiedene Mechanismen dokumentiert: Einerseits wird die MLC durch ROCK direkt phosphoryliert (Kureishi *et al.*, 1997). Andererseits verstärkt ROCK die Phosphorylierung von MLC auch indirekt, indem es die Myosin-Phosphatase durch Phosphorylierung inhibiert (Kimura *et al.*, 1996).

Viele Studien unterscheiden nicht zwischen ROCK1 und ROCK2. Auch stehen keine Inhibitoren zur Verfügung, die nur für eine der ROCK-Kinasen selektiv sind. siRNA (kleine interferierende RNA, *small interfering RNA*) -vermittelte Depletion der einzelnen ROCKs erlaubte dennoch die Untersuchung ihrer individuellen Funktionen in migrierenden Zellen: ROCK1 wird für die Kontraktion im hinteren Teil der Zelle benötigt; ROCK2 dagegen ist für die Direktionalität der Migration wichtig, da es die Ausbildung von Membranausstülpungen abseits der Haupt-Migrationsrichtung verhindert (Vega *et al.*, 2011).

Auch die Maturierung von Fokaladhäsionen, die die Zelle mit der extrazellulären Matrix verknüpfen, ist von RhoA abhängig und wird vermutlich über ROCK vermittelt: Lysophosphatidylsäure (LPA, *lysophosphatidic acid*) aktiviert RhoA, was nicht nur zu verstärkter Bildung von Stressfasern, sondern auch zur Maturierung von Fokaladhäsionen führt. Auch aktives RhoA alleine genügt, um die Maturierung von Fokaladhäsionen zu induzieren. Die Inhibition der Myosin-vermittelten Kontraktion verhindert jedoch beide Wirkungen von LPA, woraus geschlossen werden kann, dass auch die Wirkung von RhoA auf Fokaladhäsionen durch ROCK vermittelt wird (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996). RhoA induziert nicht nur Kontraktilität von Aktin-Stressfasern, es stabilisiert auch Aktin-Filamente. Diese Wirkung wird ebenfalls über ROCK vermittelt (Maekawa *et al.*, 1999): Es aktiviert die LIM-Kinasen 1 und 2 durch Phosphorylierung, welche wiederum das Aktin-depolymerisierende Protein Cofilin durch Phosphorylierung deaktivieren.

RhoA hat neben ROCK weitere direkte Effektoren, die das Aktin-Zytoskelett modulieren. Einer davon ist das Formin mDia1 (Watanabe *et al.*, 1999): Aktives RhoA bindet mDia1 und löst dessen Autoinhibition, woraufhin mDia1 neue Aktin-Filamente assembliert. Eine weitere Wirkung aktiven RhoAs, die durch mDia1 vermittelt wird, ist die Stabilisierung und Orientierung von Mikrotubuli (Palazzo *et al.*, 2001).

Auch Kontakte zwischen benachbarten Zellen, die Adhärenz-Verbindungen, unterliegen dem Einfluss von RhoA. Hier sind die RhoA-Effektoren ROCK und mDia1 offenbar Gegenspieler: So werden die Adhärenz-Verbindungen sowohl durch die Aktivierung des RhoA-Effektors ROCK als auch durch die Inaktivierung von RhoA zerstört (Sahai und Marshall, 2002). Der letztgenannte Effekt kann jedoch durch die aktive Form des RhoA-Effektors mDia1

verhindert werden (Sahai und Marshall, 2002). LPA-Behandlung von Colonkarzinom-Zellen führt zur Zerstörung der Adhärenz-Verbindungen, was auf die Aktivierung des RhoA-ROCK-Signalweges zurückgeführt wurde (Leve *et al.*, 2011). Versuche von Sahai und Marshall mit überexprimierten, konstitutiv aktiven Rho-GTPasen legen jedoch nahe, dass der Signalweg RhoA-mDia1 in Colonkarzinom-Zellen vorrangig vor dem Signalweg RhoA-ROCK ist und dass ROCK-vermittelte Zerstörung der Adhärenz-Verbindungen stattdessen auf RhoC zurückzuführen ist (Sahai und Marshall, 2002).

Die Cytokinese ist ein weiterer Aktin-Myosin-basierter Prozess und daher in besonderem Maße von RhoA abhängig: Hier wirken viele seiner Effektoren zusammen. RhoA, ROCK und eine weitere RhoA-Effektor-Kinase, Citron, sind während der Kontraktion der Teilungsfurche stark am cytokinetischen Ring lokalisiert (Kosako *et al.*, 2000). Vermutlich kooperieren die Kinasen bei der Kontraktion der Teilungsfurche miteinander: Inhibition von ROCK verlangsamt die Cytokinese, ohne sie jedoch vollständig zu unterbinden (Kosako *et al.*, 2000). Citron phosphoryliert in der Cytokinese ebenfalls MLC, jedoch nicht die Myosin-Phosphatase (Yamashiro *et al.*, 2003). Der Einfluss von RhoA auf die Mitose, die der Cytokinese vorausgeht, wurde erst später gezeigt. So stellten Rosenblatt *et al.* fest, dass sowohl ROCK als auch Myosin II für die korrekte Separation der Centrosomen und den Aufbau der Mitose-Spindel notwendig sind (Rosenblatt *et al.*, 2004).

Auch die Aktivierung von Genen, die unter der Kontrolle des SRF (Serum-Response-Faktor) stehen, kann durch RhoA vermittelt werden (Hill *et al.*, 1995). Dies geschieht in Reaktion auf externe Stimuli wie Serum, LPA oder AlF_4^- . Hinweise auf den Mechanismus dieser Aktivierung wurden erst später gefunden und legen nahe, dass auch diese Funktion von RhoA durch Änderung des Aktin-Zytoskeletts vermittelt wird: SRF kann RhoA-abhängig durch LIM-Kinase aktiviert werden, die, wie oben bereits erwähnt, die Polymerisation von Aktin-Filamenten fördert. Für die Aktivierung von SRF genügt jedoch auch Behandlung der Zellen mit Wirkstoffen, die die G-Aktin-Menge herabsetzen, wie Cytochalasin D und Swinholid A. Dagegen verhindern erhöhte G-Aktin-Mengen, z.B. durch Überexpression von Aktin, die Aktivierung (Sotiropoulos *et al.*, 1999). Die Vermittlung zwischen G-Aktin-Menge und SRF-Aktivität schließlich geschieht durch den SRF-Cofaktor MAL. Dieser bindet an G-Aktin und liegt in unstimulierten Zellen cytosolisch vor. Aufgrund der RhoA-vermittelten Aktin-Polymerisation wird er von G-Aktin freigesetzt, was Voraussetzung für seine nukleare Lokalisation und die Aktivierung des SRF durch RhoA ist (Miralles *et al.*, 2003).

Etliche der durch RhoA regulierten Prozesse treten als Bestandteil des komplexen Übergangs vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*)

auf. Dieser aus der Embryonalentwicklung bekannte Prozess kann auch in adultem Epithel induziert werden und umfasst den Verlust der apiko-basolateralen Polarisierung und der Zell-Zell-Kontakte sowie erhöhte Beweglichkeit der Zellen (Greenburg und Hay, 1982). Diese Prozesse treten jedoch auch bei der Metastasierung von Tumoren auf. Der Nachweis, dass metastasierende Tumorzellen *in vivo* ebenfalls EMT durchlaufen, wurde vor einigen Jahren erbracht (Trimboli *et al.*, 2008). *In vitro*-Modelle zur Untersuchung von EMT werden bereits viel länger genutzt: Eines davon ist die Stimulation von MDCK-Zellen mit HGF (Hepatocyten-Wachstumsfaktor, *hepatocyte growth factor*), in der die Rolle von RhoA gut dokumentiert ist (Ridley *et al.*, 1995; Zondag *et al.*, 2000; Cozzolino *et al.*, 2003). Auch die HGF-induzierte EMT von Tumorzellen wurde charakterisiert, so z.B. die der humanen Lungenkarzinom-Zelllinie A549 (Yi *et al.*, 1998). Die Relevanz von HGF für Krebserkrankungen der Lunge ist daraus ersichtlich, dass die Expression des HGF-Rezeptors in Lungentumoren mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf verbunden ist (Ichimura *et al.*, 1996; Takanami *et al.*, 1996).

Aus den vorangegangenen Beschreibungen wird deutlich, dass RhoA in der Zelle viele verschiedene Funktionen ausführt. Diese sind teilweise gegensätzlich, wie z.B. die Aktin-Polymerisation sowohl als Komponente in der Zellmigration, als auch zur Aufrechterhaltung von Adhärenz-Verbindungen zwischen epithelialen Zellen. Dennoch gibt es starke Überschneidungen hinsichtlich der beteiligten direkten und indirekten Effektoren. Die Regulation von RhoA selbst muss nicht nur seinen GTP-Bindungsstatus, sondern auch seine Lokalisation und gezielte Interaktion mit einzelnen Bindungspartnern bestimmen, um die Koordination all seiner Funktionen zu ermöglichen. Im folgenden Abschnitt sollen einige der Mechanismen erläutert werden, die dazu zur Verfügung stehen.

1.1.2 Regulation von RhoA

Die Änderung des Nukleotid-Bindungszustandes von RhoA durch GEFs und GAPs ist der augenfälligste Regulationsmechanismus seiner Aktivität. Es stehen jedoch noch weitere Mechanismen zur Verfügung, um die Regulation zu verfeinern, sie flexibler, spezifischer, stringenter oder ökonomischer zu gestalten. Die Bindung an RhoGDIs zählt ebenso zu diesen Mechanismen wie kovalente Modifikation oder sogar die Degradation von RhoA. In komplexen biologischen Vorgängen greifen die verschiedenen Mechanismen ineinander und sind schwer separat voneinander zu betrachten. Die Grundlagen der einzelnen Regulations-Mechanismen sollen hier jedoch, soweit möglich, getrennt voneinander erläutert werden.

1.1.2.1 GEFs

GEFs sind die Aktivatoren der Rho-GTPasen. Hart *et al.* untersuchten, wie die Interaktion zwischen RhoA und dem GEF Dbl vom Nukleotid-Bindungsstatus der GTPase beeinflusst wird: Sie stellten fest, dass Dbl die stärkste Interaktion zur Nukleotid-freien Form von RhoA ausbildet; die Affinität zur GDP-gebundenen Form ist schwächer, die zur GTP-gebundenen Form nicht nachweisbar (Hart *et al.*, 1994). Derartiges Bindungsverhalten stimmt gut mit der Aufgabe eines GEFs überein, GDP-gebundene GTPasen zu binden, die Freisetzung des Nukleotids zu fördern und seinerseits nach Bindung eines GTP-Moleküls die Bindung zur GTPase wieder zu lösen. Einige GEFs, wie z.B. Vav2, können den Nukleotidaustausch an verschiedenen Rho-GTPasen katalysieren (Abe *et al.*, 2000). Andere sind für eine einzige GTPase spezifisch, so z.B. ITSN-1 für Cdc42 (Hussain *et al.*, 2001). Aufgrund der hohen Homologie zwischen RhoA, RhoB und RhoC ist allerdings kein GEF bekannt, das nachweislich nur für RhoA spezifisch ist. Die Aminosäuren in RhoA, die dafür bestimmend sind, welche GEFs der Dbl-Familie gegenüber RhoA GEF-Aktivität zeigen, sind R5, V43, D45, E54, A56 und W58 (Snyder *et al.*, 2002). Die Gesamtgröße eines GEFs kann die seiner GEF-Domäne um ein Mehrfaches übersteigen, da viele GEFs über zusätzliche funktionale Domänen verfügen. So vielfältig wie die zusätzlichen funktionalen Domänen sind auch die Mechanismen, nach denen GEFs die Aktivität von RhoA gezielt infolge bestimmter Stimuli, in bestimmten Zellkompartimenten und/oder in Gegenwart bestimmter Effektoren aktivieren. Hier soll nur ein Beispiel dafür herausgegriffen werden:

Das Rho-GEF Ephexin ist an der Rezeptor-Tyrosin-Kinase EphA4 lokalisiert, die an der Führung wachsender Axone beteiligt ist. Seine Rho-GTPase-Spezifität wird zusätzlich durch die Stimulation dieses Rezeptors gesteuert (Shamah *et al.*, 2001): Ist EphA4 inaktiv, zeigt Ephexin GEF-Aktivität sowohl gegenüber RhoA, als auch gegenüber Rac1 und Cdc42. Wird EphA4 jedoch aktiviert, ändert sich die Substrat-Spezifität von Ephexin: Seine GEF-Aktivität gegenüber Rac1 und Cdc42 wird unterdrückt, die gegenüber RhoA wird hingegen verstärkt, woraus eine lokal begrenzte, Stimulus-abhängige Erhöhung der RhoA-Aktivität resultiert. Dieser Regulationsmechanismus ist auch ein Beispiel dafür, wie Signalwege dreier Rho-GTPasen durch ein GEF miteinander verknüpft werden.

1.1.2.2 GAPs

Die GAP-Aktivität von Rho-GAPs wird durch einen konservierten Arginin-Rest vermittelt, der mit dem katalytisch aktiven Q63 des RhoAs sowie mit dem gebundenen GTP interagiert und dadurch den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse stabilisiert (Rittinger *et al.*, 1997).

Passend zu ihrer Aufgabe, mit GTP-gebundenen GTPasen zu interagieren, die GDP-gebundenen GTPasen nach der Hydrolyse des Nukleotids jedoch wieder freizusetzen, binden GAPs stärker an RhoA, das mit einem GTP-Analagon beladen ist, als an RhoA, welches GDP-gebunden ist (Zhang und Zheng, 1998). Dieser Unterschied ist jedoch nicht für alle GAPs gleich groß: So binden die Rho-GAPs p190A und p50RhoGAP zwar GTP-Analagon-gebundenes RhoA mit vergleichbarer Effizienz. Die Affinität von p190A für GTP-Analagon-gebundenes RhoA ist jedoch 15mal größer, die von p50RhoGAP dagegen nur dreimal größer als gegenüber dem GDP-gebundenen RhoA (Zhang und Zheng, 1998). Die RhoA-GAP-Aktivität von p50RhoGAP ist demnach durch Produkt-Inhibition negativ reguliert. Ähnlich wie für Rho-GEFs gilt auch für Rho-GAPs, dass ihre Größe die der katalytisch aktiven GAP-Domäne um ein Mehrfaches übersteigen kann, weil sie zahlreiche weitere funktionale Domänen enthalten können, die zahlreiche weitere Regulationsmechanismen zulassen. Hier soll ein Beispiel aufgeführt werden, in denen ein Rho-GAP den Signalweg von RhoA mit denen anderer Rho-GTPasen verknüpft:

Bereits in Abschnitt 1.1.1 wurde beschrieben, dass der RhoA-Effektor ROCK2 den Rac1-abhängigen Prozess der Ausbildung von Membranausstülpungen räumlich begrenzt unterdrückt und dadurch zur Direktionalität der Migration beiträgt (Vega *et al.*, 2011). Vermittelt wird diese Inhibition durch ein GAP, das gegenüber Rac1 aktive FilGAP: Dieses wird durch ROCK phosphoryliert und dadurch aktiviert, was die Inaktivierung von Rac1 zur Folge hat. Der Polarisationsverlust infolge von ROCK-Inhibition wird durch konstitutiv aktives FilGAP unterdrückt (Ohta *et al.*, 2006). Dieser RhoA-ROCK2-FilGAP-Rac1-Signalweg ist ein Beispiel dafür, wie RhoA die Aktivität von Rac1 negativ reguliert.

In dieser Arbeit wurde die Regulation von RhoA durch das Rho-GAP p190A untersucht. Der folgende Abschnitt stellt dieses GAP daher detaillierter vor.

1.1.2.3 Das RhoA/Rac1-GAP p190A: Wechselwirkung zwischen RhoA- und Rac1- und Ras-Signalwegen

p190A besteht aus 1499 Aminosäuren und hat ein ungefähres Molekulargewicht von 190 kDa. Abbildung 1.3 zeigt schematisch die Domänenstruktur des Proteins, verändert nach Tcherkezian und Lamarche-Vane, 2007. Das Protein enthält außer der C-terminalen RhoGAP-Domäne (RhoGAP) auch selbst eine GTPase-Domäne (GTPase), dazwischen vier FF-Domänen, welche jeweils zwei konservierte Phenylalanin-Reste tragen (FF) sowie eine Prolin-reiche Region (P).



Abbildung 1.3: Domänenstruktur von p190A. Verändert nach Tcherkezian und Lamarche-Vane, 2007. GTPase: GTPase-Domäne; FF: Domäne mit zwei konservierten Phenylalanin-Resten; P: Prolin-reiche Domäne; GAP: GAP-Domäne.

p190A wurde zunächst als ein 190 kDa schweres, stark phosphoryliertes Protein identifiziert, das sowohl in nach Behandlung mit EGF (epidermaler Wachstumsfaktor, *epidermal growth factor*) als auch in transformierten Zellen an ebenfalls phosphoryliertes p120RasGAP bindet (Ellis *et al.*, 1990). Spätere Studien bestätigten dieses Ergebnis und lieferten genauere Einblicke in die Phosphorylierung, Aufbau und Funktion des Proteins: p120RasGAP trägt N-terminal zwei SH2-Domänen, die an der Bindung zu p190A beteiligt sind (Bryant *et al.*, 1995; Hu und Settleman, 1997). An p190A selbst ist es Y1105, dessen Phosphorylierung durch c-Src die Assoziation mit p120RasGAP vermittelt (Roof *et al.*, 1998). In derselben Studie wurde jedoch auch gezeigt, dass auch ohne diese Phosphorylierung in verringertem Maße Komplexbildung zwischen p120RasGAP und p190A möglich ist. Die Untersuchung der GAP-Aktivität von p190A *in vitro* erbrachte kontroverse Ergebnisse: Während Settleman *et al.* GAP-Aktivität gegenüber RhoA und RhoB, Rac1 und Rac2 sowie Cdc42 nachwiesen (Settleman *et al.*, 1992), konnte in einer anderen Studie keine *in vitro*-GAP-Aktivität gegenüber Rac1 festgestellt werden (Ridley *et al.*, 1993). Auch die Regulation von p190A ist nicht vollständig geklärt: Die isolierte C-terminale GAP-Domäne des Proteins ist *in vitro* wie *in vivo* konstitutiv aktiv und vermittelt die permanente Auflösung von Stressfasern, was an den transienten Verlust von Stressfasern infolge EGF-Behandlung erinnert. Eine GAP-inaktive Mutante der Domäne (1283D) verhindert dagegen den transienten Stressfaser-Verlust durch EGF (Haskell *et al.* 2001). Die Studie von Haskell *et al.* zeigte, dass die mittlere Domäne von p190A, welche auch die Phosphorylierungsstelle Y1105 trägt, die GAP-Aktivität von p190A *in vivo* inhibiert. Die Inhibition wird aufgehoben, wenn Y1105 phosphoryliert wird. Die Bindung an p120RasGAP könnte an der Aufhebung der Inhibition beteiligt sein: McGlade *et al.* überexprimierten den p190A-bindenden N-Terminus von p120RasGAP (McGlade *et al.*, 1993). Der resultierende Phänotyp war dem der Überexpression der isolierten, konstitutiv aktiven p190A-GAP-Domäne (Haskell *et al.*, 2001; Ridley *et al.*, 1993) ähnlich, was nahelegt, dass der p120RasGAP-N-Terminus eine aktivierende Wirkung auf p190A hat.

Die isolierte, unregulierte GAP-Domäne von p190A scheint *in vivo* hauptsächlich RhoA gegenüber GAP-Aktivität zu zeigen. In verschiedenen Studien wurde eine Rolle von p190A in der gegenseitigen Regulation von Rac1 und RhoA beschrieben. p190A wirkt dabei als RhoA-GAP, dessen Aktivierung durch Rac1 vermittelt wird. Die Konsequenz ist eine inhibierende

Wirkung von Rac1 auf RhoA. Dies kann sowohl unabhängig von Src-Kinasen durch Bildung reaktiver Sauerstoff-Spezies durch aktives Rac1 geschehen (Nimnual *et al.*, 2003), als auch abhängig von Src-Kinasen infolge von Wechselwirkungen mit der extrazellulären Matrix (ECM, *extracellular matrix*) (Noren *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2004). Dennoch gibt es Hinweise auf eine *in vivo*-GAP-Aktivität auch gegenüber Rac1: Der Phänotyp, den die Überexpression von p190A in COS-Zellen zeigt, kann nicht nur durch die Expression von konstitutiv aktivem RhoA, sondern auch durch die Expression von konstitutiv aktivem Rac1 unterdrückt werden (Tatsis *et al.*, 1998). *In vitro* wurde gezeigt, dass die Substratspezifität von p190A von Phospholipid-Bindung abhängig ist (Ligeti *et al.*, 2004). Eine spätere Studie (Lévay *et al.*, 2009) zeigte, dass Phosphorylierung von p190A durch PKC (Protein-Kinase C) seine Phospholipid-Bindung reguliert. Überexpression von vollständig regulierbarem p190A in COS-7-Zellen verursachte zwei gegensätzliche Phänotypen, die an den Effekt von aktiviertem Rac1 bzw. aktiviertem RhoA erinnerten und nahezu zu gleichen Anteilen vertreten waren. Dagegen verursachte eine p190A-Mutante, welche keine Phospholipid-Bindung eingehen konnte, nur den Rac1-Aktivierungs-Phänotyp, und eine Mutante, bei der die Phospholipid-Bindung verstärkt war, nur den RhoA-Aktivierungs-Phänotyp. Diese Studie demonstriert, dass p190A und seine Regulation durch PKC möglicherweise eine wechselseitig funktionierende Verbindung zwischen den RhoA- und Rac1-Signalnetzwerken darstellt. Darüber hinaus ermöglicht die Bindung zwischen p120RasGAP und p190A, die Aktivitäten von Ras- und Rho-GTPasen räumlich miteinander zu koordinieren.

Die Stimulation von Fibroblasten mit EGF bewirkt die Aktivierung von p190A; seine GAP-Aktivität ist auch Voraussetzung für die RhoA-vermittelten Effekte der EGF-Stimulation (Haskell *et al.*, 2001). Die Aktivierung infolge der EGF-Stimulation erfolgt durch c-Src-abhängige Phosphorylierung (Haskell *et al.*, 2001). Tomar *et al.* zeigten einen ähnlichen Signalweg infolge der Stimulation von Integrin-Rezeptoren; allerdings wurde in diesem Zusammenhang die Aktivierung von p190A durch FAK (Fokaladhäsions-Kinase) gezeigt und eine mögliche Beteiligung von c-Src vermutet (Tomar *et al.*, 2009). Wenngleich die Beteiligung von FAK und c-Src auch in der HGF-induzierten c-Met-Signalkaskade belegt ist (Rahimi *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2000), so wurde dennoch nie eine potentielle Rolle von p190A als Regulator der RhoA-vermittelten dynamischen Prozesse in der HGF-Reaktion überprüft. Eine entsprechende Untersuchung in Lungenkarzinomzellen könnte dazu beitragen, den ungünstigen Einfluss der c-Met-Signalkaskade auf den Verlauf von Krebserkrankungen der Lunge zu verstehen (Ichimura *et al.*, 1996; Takanami *et al.*, 1996) und entsprechende Strategien für therapeutische Maßnahmen zu entwickeln.

1.1.2.4 Posttranslationale Modifikationen

Die häufigste posttranslationale Modifikation von Rho-GTPasen ist die Prenylierung ihres C-Terminus. Rho-GTPasen tragen eine C-terminale CAAX-Box (C: Cystein; A: aliphatische Aminosäure; X: beliebige Aminosäure), deren Cystein-Rest prenyliert wird (Katayama *et al.*, 1991; Adamson *et al.*, 1992a). Einige Rho-GTPasen können zusätzlich an Cystein-Resten in der Nähe des C-Terminus palmitoyliert werden. Diese posttranslationalen Modifikationen ermöglichen die Interaktion mit Membranen sowie mit RhoGDIs (Abschnitt 1.1.2.5). Die CAAX-Box von RhoA wird geranylgeranyliert, und es enthält keinen palmitoylierbaren Cystein-Rest (Katayama *et al.*, 1991). Darin unterscheidet es sich von der ansonsten hochhomologen Rho-GTPase RhoB: Für diese treten sowohl Geranylgeranylierung als auch Farnesylierung auf, und sie besitzt zwei Palmitoylierungsstellen (Adamson *et al.*, 1992a). Entsprechend ihrer unterschiedlichen Prenylierungen und Palmitoylierungen lokalisieren RhoA und RhoB in der Zelle unterschiedlich (Adamson *et al.*, 1992b), was eine räumliche Trennung ihrer Funktionen ermöglicht. Darüber hinaus scheint auch die Geschwindigkeit der Prenylierung reguliert zu sein: Eine bestimmte Variante des RhoGEFs SmgGDS bindet bevorzugt unprenylierte Rho-GTPasen. Die Prenylierung von RhoA wird durch die Interaktion mit SmgGDS verlangsamt (Berg *et al.*, 2010). Die Möglichkeit, bereits synthetisiertes, unprenyliertes RhoA in der Zelle zu lagern, stellt eine Stufe der Regulation zwischen Translation und GDP/GTP-Austausch dar, die dem Regulationsnetzwerk zusätzliche Flexibilität verleiht.

Eine weitere Variante der posttranslationalen Modifikationen von RhoA ist seine Phosphorylierung an Serin 188. Diese kann unter anderem durch die Protein-Kinasen A und G vorgenommen werden (Lang *et al.*, 1996; Sauzeau *et al.*, 2000). Die Interaktion mit RhoGDI wird durch die Phosphorylierung verstärkt (Lang *et al.*, 1996; Forget *et al.*, 2002; Ellerbroek *et al.*, 2003; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Dies wirkt einerseits deaktivierend auf RhoA (Ellerbroek *et al.*, 2003), andererseits wird RhoA dadurch vor Degradation geschützt (Sauzeau *et al.*, 2003; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Es muss angemerkt werden, dass die Phosphorylierung auch die Bindung GTP-beladenen RhoAs an RhoGDI verstärkt (Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Ein biologisch relevanter Prozess, in dem RhoA durch Phosphorylierung reguliert wird, schließt die Beteiligung von RhoGDI ein und wird daher in Abschnitt 1.1.2.5 beschrieben. Die Phosphorylierung wirkt sich *in vitro* auch auf die Präferenz von RhoA für bestimmte Effektoren aus: Die Bindung von ROCK nimmt ab, während die Interaktionen mit Rhotekin und mDia1 nicht beeinflusst werden (Nusser *et al.*,

2006). Die biologische Relevanz dieses Aspekts der RhoA-Phosphorylierung wurde jedoch noch nicht untersucht.

Die Ubiquitylierung ist eine weitere häufige kovalente Modifikation an RhoA. Für RhoA ist die Poly-Ubiquitylierung zum Zweck der proteasomalen Degradation dokumentiert: E3-Ligasen, die die Ubiquitylierung von RhoA vornehmen, sind Smurf-1 (Wang *et al.*, 2003) und Cullin-3 (Chen *et al.*, 2009). Beide E3-Ligasen sind *in vivo* an der Regulation RhoA-abhängiger Prozesse beteiligt: Wang *et al.* zeigten, dass die Lokalisation von Smurf-1 im Leitsaum migrierender Zellen für die Migration notwendig ist (Wang *et al.*, 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass die Depletion von Cullin-3 die Zellmigration vermindert (Chen *et al.*, 2009). Eine genauere Beschreibung der RhoA-Degradation als Regulationsmechanismus in biologischen Prozessen erfolgt in einem separaten Abschnitt (1.1.2.6).

Der Zelle stehen weitere Möglichkeiten zur Verfügung, um RhoA durch posttranslationale Modifikationen zu regulieren: HypE beispielsweise inhibiert RhoA, indem es einen Tyrosin-Rest in dessen Effektor-Bindedomäne (Y34) mit einem sterisch anspruchsvollen AMP koppelt (Worby *et al.*, 2009). Die biologische Funktion dieses Regulationsmechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Andererseits ist auch die kovalente Aktivierung von RhoA möglich: Transglutaminasen binden Amine mittels einer Amid-Bindung an Q63 und unterbinden dadurch die GTP-Hydrolyse an RhoA (Singh *et al.*, 2001; Walther *et al.*, 2003). Die beiden genannten Studien zeigten, dass Transglutaminierung als Regulationsmechanismus der RhoA-Aktivität in der Zelldifferenzierung und in der Sekretion durch Blutplättchen genutzt wird.

1.1.2.5 RhoGDI

Im Vergleich zu Rac1 und Cdc42 liegt RhoA in ruhenden Zellen nur zu einem recht geringen Anteil membrangebunden vor (Michaelson *et al.*, 2001). Cytosolische Rho-GTPasen sind zumeist an RhoGDI gebunden, andernfalls unterliegen sie schneller proteasomaler Degradation (Boulter *et al.*, 2010). RhoGDI verfügt über eine hydrophobe Tasche, die bei der Bindung einer Rho-GTPase deren Prenylrest aufnimmt und dadurch die cytosolische Lokalisation begünstigt (Longenecker *et al.*, 1999). Die Affinität von RhoGDI zu unprenyliertem RhoA ist sehr gering, die zu prenyliertem GTP-RhoA allerdings sehr hoch, wenn auch geringer als zu GDP-RhoA (Tnimov *et al.*, 2012). Die Dissoziation des GTPase-gebundenen Nukleotids und dadurch auch die darauffolgende Aktivierung der gebundenen GTPase werden durch RhoGDI verhindert (Ueda *et al.*, 1990; Hart *et al.*, 1992). Jedoch inhibiert RhoGDI auch die spontane und induzierte GTP-Hydrolyse gebundener GTP-

beladener GTPasen, verhindert also auch deren Inaktivierung (Hart *et al.*, 1992; Hancock *et al.*, 1993). Die Eigenschaft von RhoGDI, die Aktivierung von RhoA zu limitieren, überwiegt jedoch (Ueda *et al.*, 1990; Hart *et al.*, 1992, Sasaki *et al.*, 1993). Die Gesamtmenge an RhoGDI in einer Zelle entspricht ungefähr der Gesamtmenge seiner Bindungspartner RhoA, Rac1 und Cdc42 (Michaelson *et al.*, 2001). Wie bereits in Abschnitt 1.1.2.4 erwähnt, wird durch Phosphorylierung von RhoA seine Bindung an RhoGDI verstärkt und gleichzeitig die Bevorzugung GDP-gebundenen RhoAs gegenüber GTP-gebundenem RhoA verringert (Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Die Regulation von RhoA durch Phosphorylierung und dadurch veränderte RhoGDI-Bindung in einem biologischen Prozess wurde durch Tkachenko *et al.* gezeigt: Die Zyklen von Membranausstülpung und -rückfaltung am Leitsaum migrierender Zellen werden durch Protein-Kinase A koordiniert, indem diese RhoA wiederholt phosphoryliert, dadurch seine RhoGDI-Bindung induziert und die Aktivierung von RhoA-Effektoren verhindert (Tkachenko *et al.*, 2011). Die Tatsache, dass RhoGDI ein wichtiger Faktor bei der Regulierung der Gesamt-Rho-GTPasen-Menge in einer Zelle ist, wurde eindrucksvoll von Boulter *et al.* gezeigt: Durch Depletion von RhoGDI werden auch jene GTPasen depletiert, die RhoGDI binden; durch Überexpression von RhoGDI steigt auch deren Menge an. Wie eng die Mengen der Rho-GTPasen mit der von RhoGDI verknüpft sind, zeigt sich darin, dass sogar Überexpression oder Depletion einer einzelnen, RhoGDI-bindenden GTPase die Mengen der anderen entsprechend verringert bzw. erhöht (Boulter *et al.*, 2010). Der durch RhoGDI vermittelte Degradationsschutz erweitert seinen Status über den eines bloßen RhoA-Inhibitors hinaus: Es kann dadurch dem Zusammenhang zwischen Aktivierung und Degradation von RhoA entgegenwirken, der im folgenden Abschnitt behandelt wird.

1.1.2.6 Degradation

Bereits in Abschnitt 1.1.2.4 wurde erwähnt, dass RhoA durch Poly-Ubiquitylierung zur proteasomalen Degradation markiert werden kann und dass entsprechende E3-Ligasen während der Zellmigration aktiv sind. Doye *et al.* wiesen anhand eines pathologischen Prozesses nach, dass es die Aktivierung von Rho-GTPasen ist, die deren Degradation auslöst (Doye *et al.*, 2002): Das Toxin CNF1 aus *E. coli* deamidiert Q63 an RhoA und ebenso die homologen Reste an Rac1 und Cdc42. Das führt, ähnlich einer Transglutaminierung (Abschnitt 1.1.2.4), zur konstitutiven Aktivierung der GTPasen. Letztlich werden in Zellen, die mit CNF1 behandelt werden, die GTPasen dennoch nur transient aktiviert, da infolge der Aktivierung ihre proteasomale Degradation einsetzt. Für Rac1 wurde in weiteren

Untersuchungen gezeigt, dass auch andere konstitutiv aktive Formen der GTPase unabhängig von Virulenz-Faktoren der verstärkten proteasomalen Degradation unterliegen. Ebenso stellten Doye *et al.* fest, dass die auf die Aktivierung folgende Degradation der GTPasen eine Voraussetzung für effiziente Invasion der *E. coli* in die Wirtszellen ist. Demnach ist die verstärkte Degradation ein zelleigener Regulationsmechanismus für aktivierte Rho-GTPasen, den die Bakterien sich für die Invasion zunutze machen. In Prozessen, in denen aktiviertes RhoA immer wieder in kurz aufeinanderfolgenden Zyklen benötigt wird, wie bei der von Tkachenko *et al.* beschriebenen Membrandynamik migrierender Zellen (Tkachenko *et al.*, 2011), erscheint es ökonomisch, auch RhoGDI an der Regulation von RhoA zu beteiligen (vgl. Abschnitt 1.1.2.5): Der durch RhoGDI vermittelte Degradationsschutz könnte einen übermäßigen Verlust von RhoA infolge proteasomaler Degradation vermeiden.

1.2 Methoden zur Untersuchung der Funktion und Aktivität von RhoA

1.2.1 Konstitutiv aktive und dominant negative Mutationen

Eine der ältesten Methoden, die Funktionen von Rho-GTPasen zu untersuchen, ist die exogene Expression oder Injektion der GTPase, deren Eigenschaften durch Mutation zusätzlich verändert werden können. Ähnlich der Transglutaminierung von Q63, verliert RhoA durch die Mutation Q63L die Fähigkeit zur GTP-Hydrolyse (Mayer *et al.*, 1999; Longenecker *et al.*, 2003). Es liegt dadurch permanent in GTP-gebundener, aktiver Form vor. Boulter *et al.* haben jedoch einen Nachteil dieser Methode festgestellt: Bindet eine überexprimierte GTPase endogenes RhoGDI, steht dieses nicht mehr zur Bindung der endogenen GTPasen zur Verfügung. Deren Mengen werden dadurch verringert (Boulter *et al.*, 2010). Der beobachtete Phänotyp von Q63L-RhoA-exprimierenden Zellen kann daher auch zum Teil durch die Depletion von Rac1 und/oder Cdc42 verursacht sein. Boulter *et al.* stellten in derselben Studie fest, dass Coexpression von RhoGDI diese Depletion verhindern kann, jedoch Überexpression von RhoGDI wiederum die Mengen der endogenen RhoGDI-bindenden GTPasen erhöht. Die Mengen exogenen Q63L-RhoAs, exogenen RhoGDIs und endogener, RhoGDI-bindender GTPasen müssten demnach präzise aufeinander abgestimmt sein, um den Effekt des konstitutiv aktiven RhoAs im Kontext der unveränderten Mengen und Aktivitäten der endogenen GTPasen untersuchen zu können. Eine einfachere Möglichkeit ist es, die Expression des Q63L-RhoAs auf geringe Mengen zu limitieren, deren Einfluss auf die endogenen GTPasen dann gering sein müsste. Hierfür kann z.B. ein Expressionsvektor mit

verringerten Promotor-Effizienz genutzt werden, der in anderen Zusammenhängen für Einzel-Molekül-Mikroskopie zum Einsatz kommt (Watanabe und Mitchison, 2002).

RhoA mit der Mutation T19N dagegen ist dominant inaktiv: Es ist nicht nur selbst inaktiv, sondern verhindert auch die Aktivierung endogenen RhoA in der Zelle. Die Inaktivität des T19N-RhoA selbst erklärt sich aus veränderter Nukleotid-Bindung und -Hydrolyse: T19N-RhoA liegt verstärkt in Nukleotid-freier Form vor (Strassheim *et al.*, 2000). Die Struktur von S17N-H-Ras lässt vermuten, dass dasselbe auch für homologe Mutationen in verwandten GTPasen gilt (Nassar *et al.*, 2010). Für die homologen GTPasen H-Ras und Rac1 wurde indes gezeigt, dass entsprechende Mutationen (S17N bzw. T17N) eine Veränderung der Nukleotid-Bindung zugunsten von GDP bewirken (Feig und Cooper, 1988; Ridley *et al.*, 1992). Die T19N-Mutation erhöht auch die Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse durch RhoA: Sie ist für T19N-RhoA etwa zehnmal so schnell wie für WT-RhoA (Miyazaki *et al.*, 2002). Es ist daher auch für T19N-RhoA zu vermuten, dass selbst jene Moleküle, die in Guanin-Nukleotid-gebundener Form vorliegen, zumeist inaktiv sind, weil sie GDP gebunden haben. Die Inaktivierung des endogenen RhoA durch exogenes T19N-RhoA lässt sich dadurch erklären, dass T19N-RhoA verschiedene RhoGEFs stark bindet (Strassheim *et al.*, 2000; Baisamy *et al.*, 2009), welche dann nicht mehr zur Verfügung stehen, um endogenes RhoA zu aktivieren. Wenngleich T19N-RhoA nur mit geringer Effizienz an RhoGDI bindet (Strassheim *et al.*, 2000; Michaelson *et al.*, 2001), kann es ebenso wie überexprimiertes Q63L-RhoA zur Depletion der endogenen GTPasen nach dem gleichen Mechanismus führen (Boulter *et al.*, 2010). Auch die Tatsache, dass viele Rho-GEFs Aktivität gegenüber mehreren GTPasen zeigen (z.B. Vav2: Abe *et al.*, 2000), erschwert die Interpretation solcher Studien: Es besteht die Möglichkeit, durch die Überexpression von T19N-RhoA nicht nur die Aktivierung des endogenen RhoA, sondern auch die anderer Rho-GTPasen, die durch dieselben GEFs aktiviert werden, zu verhindern.

Die vorgestellte Methode der Überexpression von konstitutiv aktivem bzw. dominant inaktivem RhoA kann Aufschluss über seine Funktionen in der Zelle liefern. Jedoch greift die Methode massiv in die zu beobachtenden Prozesse ein. Rückschlüsse auf die Funktion von RhoA werden gezogen, indem ein natürlicher Prozess (z.B. Reaktion der Zellen auf einen Wachstumsfaktor), mit einem deutlich manipulierten Prozess (z.B. Reaktion der Zellen auf einen Wachstumsfaktor in Abwesenheit von RhoA) verglichen wird. Ältere, biochemische Methoden, die die Beurteilung der RhoA-Aktivität und -Regulation in natürlichen Prozessen zulassen, werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

1.2.2 Coimmunpräzipitationen und Aktivitäts-Pulldowns

Bei einer Coimmunpräzipitation wird ein Protein aus einem Zelllysats isoliert, indem es an einen spezifischen Antikörper bindet, welcher seinerseits an eine feste, präzipitierbare Substanz (z.B. Sepharose) gekoppelt ist. So kann festgestellt werden, welche weiteren Proteine an das Zielprotein binden; diese werden ebenfalls präzipitiert. Nach ähnlichen Prinzipien lässt sich untersuchen, welche Proteine selektiv mit aktivem oder inaktivem RhoA interagieren: Dabei wird aktives oder inaktives RhoA anstelle des Antikörpers direkt an die Sepharose gekoppelt. So wurde erstmalig gezeigt, dass ROCK1 mit GTP-gebundenem, nicht jedoch mit GDP-gebundenem RhoA interagiert (Ishizaki *et al.*, 1996).

In RhoA-Aktivitäts-Pulldowns wird nur jener Anteil des RhoAs aus einem Zelllysats isoliert, der aktiv, also zur Interaktion mit Effektoren fähig, ist. Das wird erreicht, indem eine RBD (Rho-Bindedomäne) eines RhoA-Effektors anstelle eines Antikörpers verwendet wird. Für RhoA wird hier die RBD aus Rhotekin verwendet (Ren *et al.*, 1999; Sander *et al.*, 1999; Pellegrin und Mellor, 2008). Ren *et al.* zeigten außerdem, dass das in Aktivitäts-Pulldowns isolierte RhoA tatsächlich vollständig GTP-gebunden war, obwohl der größte Teil des gesamten endogenen RhoAs GDP-gebunden vorlag (Ren *et al.*, 1999). Ein Nachteil der Methode ist jedoch, dass die RBD von Rhotekin nicht spezifisch für RhoA gegenüber RhoB und RhoC ist (Ren *et al.*, 1999); die Spezifität des Pulldowns für RhoA muss demnach mit einem RhoA-spezifischen Antikörper in der Immundetektion sichergestellt werden.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden erfordern keine Überexpression oder Depletion von RhoA. Sie können daher ein realistischeres, quantitatives Bild natürlicher Prozesse liefern. Jedoch erfordern sie die Lyse der untersuchten Zellen. Die gewonnenen Informationen sind daher stets Mittelwerte großer Zellpopulationen. Informationen über den zeitlichen Ablauf eines Prozesses können nur durch die Untersuchung separater Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten gesammelt werden. Informationen über die intrazelluläre Lokalisation der Interaktionen von RhoA oder seiner Aktivität sind mit diesen Methoden nur sehr begrenzt zugänglich, z.B. durch die Separierung von Neuriten und Zellkörpern vor der Lyse (Pertz *et al.*, 2008). Im folgenden Abschnitt werden Methoden vorgestellt, die diesen Limitierungen nicht unterliegen.

1.2.3 Intrazelluläre RhoA-Aktivitäts-Biosensoren

Die Entdeckung des GFP (grün fluoreszierendes Protein) aus der Qualle *A. victoria* (Shimomura *et al.*, 1962) eröffnete die Möglichkeit, fluoreszierende, vollständig genetisch codierte Fusionsproteine zu konstruieren und diese für fluoreszenz-mikroskopische

Untersuchungen an lebenden Zellen direkt in den Zellen exprimieren zu lassen. Fluoreszierende Proteine aus weiteren Spezies wurden für diese Anwendung nutzbar gemacht (Matz *et al.*, 1999; Karasawa *et al.*, 2004); durch Mutation natürlicher fluoreszenter Proteine entstand eine Vielzahl neuer genetisch codierter Fluoreszenzmarker mit veränderten Absorptions- und Emissionsspektren, beschleunigter Maturierung und/oder höherer Stabilität (Griesbeck *et al.*, 2001; Rizzo *et al.*, 2004; Shaner *et al.*, 2004). Besonders hervorzuheben sind CFP und YFP (cyan bzw. gelb fluoreszierendes Protein), die als FRET-Paar besonders häufig in Studien zur RhoA-Aktivität zum Einsatz kamen und kommen. Die inzwischen existierenden Varianten von GFP, CFP und YFP sind zahlreich und ihre exakte Unterscheidung ist nicht in jedem Zusammenhang notwendig. Diese Bezeichnungen werden in dieser Arbeit als Oberbegriffe verwendet, die Varianten mit einschließen. Fusionsproteine, die fluoreszierende Proteine beinhalten, werden nicht nur genutzt, um die Lokalisation von RhoA und seinen Regulatoren oder Effektoren in lebenden Zellen in Echtzeit zu verfolgen, sondern auch, um gezielt die Lokalisation der aktiven Form einer Rho-GTPase zu untersuchen. Dafür werden, wie schon bei den RhoA-Aktivitäts-Pulldowns, GTPase-bindende Domänen aus Rho-GTPase-Effektor-Proteinen genutzt. Abbildung 1.4 zeigt verschiedene Rho-GTPase-Biosensor-Designs.

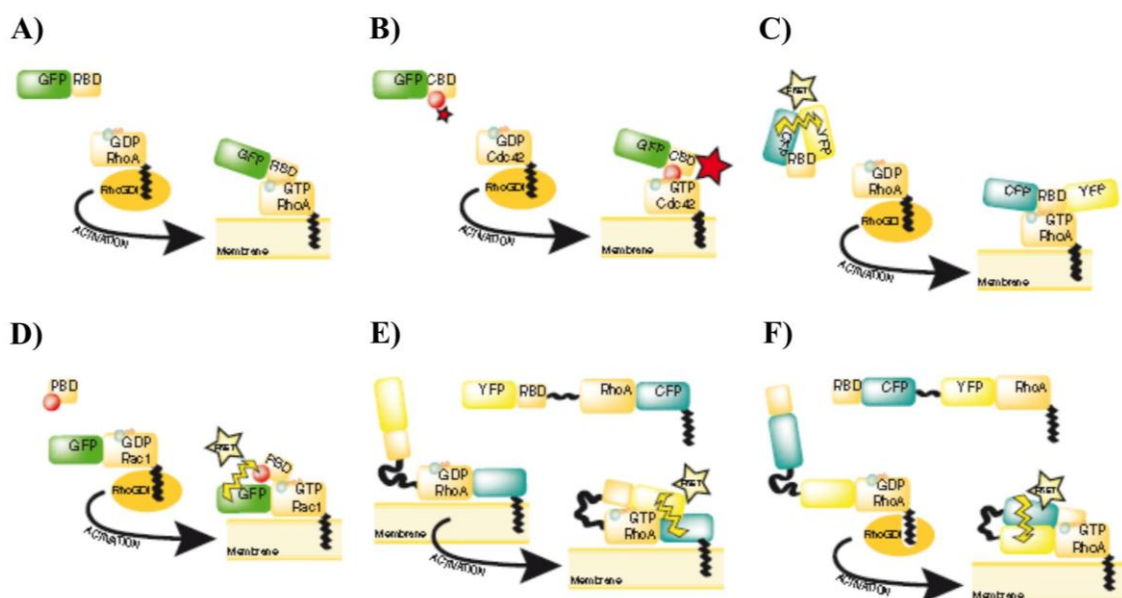


Abbildung 1.4: Verschiedene Rho-GTPase-Biosensor-Designs. Verändert nach Pertz, 2010.

Die ersten RhoGTPase-Biosensoren wurden für Cdc42 und Rac1 konstruiert: Zum Anfärben des aktiven, endogenen Cdc42 in fixierten Zellen wurde ein GFP-Konstrukt der GBD (GTPase-bindende Domäne) des Cdc42-Effektors WASP (Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein) verwendet (Cannon *et al.*, 2001). Als Kontrollen für die Spezifität des Konstruktes wurden

Zellen mit überexprimiertem dominant inaktivem T17N-Cdc42, konstitutiv aktivem Q61L-Rac1 oder konstitutiv aktivem G14V-RhoA verwendet, die sämtlich nicht von dem Konstrukt angefärbt wurden. In lebenden Zellen wurde die Lokalisation von aktivem Rac1 mittels FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer; Förster, 1948) untersucht (Kraynov *et al.*, 2000): In dieser Studie wurde ein Fusionsprotein aus regulierbarem Rac1 und GFP in lebenden Zellen überexprimiert. In diese Zellen wurde die GBD des Rac1-Effektors PAK1 (p21-aktivierte Kinase 1) injiziert, die zuvor mit einem roten Alexa-Farbstoff markiert worden war. Bindung zwischen aktivem GFP-Rac1 und der Fluoreszenz-markierten GBD führte zu FRET zwischen beiden Fluorophoren. Die FRET-Effizienz, deren räumliche und zeitliche Veränderung beobachtet werden konnte, war daher ein Maß für die Aktivität von Rac1. Diese beiden ersten GTPase-Aktivitäts-Biosensoren repräsentieren die beiden generellen Strategien, die bis heute auch für RhoA-Aktivitäts-Biosensoren vorherrschend sind: 1) Beobachtung der intrazellulären Lokalisation einer exogenen GBD (Schema s. Abbildung 1.4 A) oder 2) Beobachtung des Verhältnisses zweier Fluoreszenzen, die von der Bindung zwischen einer GTPase und einer GBD abhängig sind. Die Umsetzung der zweiten Strategie erfordert nicht in jedem Fall den Einsatz einer exogenen GTPase, intermolekularen FRET oder überhaupt FRET: So wurde ein unimolekularer, FRET-basierter RhoA-Aktivitäts-Biosensor konstruiert, der selbst kein RhoA enthält (Yoshizaki *et al.*, 2003): Er trägt an den Termini die Fluorophore YFP und CFP, dazwischen die RBD aus Rhotekin (Schema s. Abbildung 1.4 B). Durch die Bindung dieses Moleküls an endogenes, aktives RhoA wird die FRET-Effizienz zwischen CFP und YFP verringert. Ein ähnliches, jedoch nicht FRET-basiertes Design findet sich bei einem Biosensor für Cdc42 (Nalbant *et al.*, 2004): Die GBD ist in diesem Fall mit GFP und einem solvatochromischen Merocyanin-Farbstoff gekoppelt. Die Bindung des Biosensors an aktives Cdc42 erhöht die Fluoreszenz des Merocyanin-Farbstoffes, ohne jedoch die des GFPs zu verändern (Schema s. Abbildung 1.4 C). Erst vor kurzem wurde ein bimolekularer, FRET-basierter RhoA-Biosensor entwickelt, welcher vollständig genetisch codiert ist (Hinde *et al.*, 2013). Dieser ähnelt dem ersten beschriebenen Rac1-Biosensor (Kraynov *et al.*, 2000), nutzt jedoch das FRET-Paar CFP-YFP und erfordert daher nicht die Aufreinigung, *in vitro*-Fluoreszenz-Markierung und Injektion einer der Biosensor-Komponenten (Schema s. Abbildung 1.4 D). Es existieren auch RhoA-Biosensoren, die FRET-basiert sind und sowohl eine exogene RBD, als auch ein exogenes RhoA nutzen, bei denen jedoch alle Komponenten in einem einzigen Fusionsprotein vereint sind (Yoshizaki *et al.*, 2003; Pertz *et al.*, 2006). Diese Biosensoren unterscheiden sich in der Anordnung ihrer Komponenten: Das von Yoshizaki *et al.* konstruierte Raichu-RhoA trägt die Rhotekin-RBD und RhoA in der Mitte

des Konstrukts, YFP und CFP an den Termini (Schema s. Abbildung 1.4 E). Der RhoA-C-Terminus kann in diesem Konstrukt nicht prenyliert werden. Das Konstrukt trägt C-terminal jedoch den C-Terminus von K-Ras 4B, der es dennoch an Zellmembranen bindet. Der von Pertz *et al.* konstruierte RhoA-Biosensor trägt CFP und YFP in der Mitte des Konstrukts, die Rhotekin-RBD N-terminal und RhoA C-terminal (Schema s. Abbildung 1.4 F). Der RhoA-C-Terminus steht in diesem Konstrukt für die normalen posttranslationalen Modifikationen zur Verfügung.

Ein Nachteil der unimolekularen Biosensoren, die RhoA und RBD auf einem Fusionsprotein vereinen, ist, dass ihre dynamische Breite vergleichsweise gering ist: Es kann nur ein kleiner Faktor zwischen den Signalen vollständig aktivierten und vollständig inaktivierten RhoAs erwartet werden, ein noch geringerer innerhalb einer Zelle unter physiologischen Bedingungen. Die dynamischen Breiten von uni- und bimolekularen RhoA-Biosensoren können anhand der Literatur nicht direkt verglichen werden, da für den bimolekularen Biosensor noch keine entsprechenden Angaben vorliegen. Wird der unimolekulare RhoA-Biosensor von Pertz *et al.* nach der Methode der FRET-stimulierten Akzeptor-Emission verwendet, wird in den erhaltenen Quotientenbildern selten eine dynamische Breite von über 2 beobachtet (Pertz *et al.*, 2006; Machacek *et al.*, 2009). Ein bimolekularer Rac1-Biosensor zeigt unter denselben Bedingungen dynamische Breiten von über 20 (Machacek *et al.*, 2009). Dieser Unterschied ist nicht den unterschiedlichen untersuchten GTPasen zuzuschreiben: Yoshizaki *et al.* konstruierten unimolekulare, FRET-basierte Raichu-Biosensoren für RhoA und Rac1, deren dynamische Breiten sich sehr ähnlich sind (Yoshizaki *et al.*, 2003). Die Verwendung unimolekularer, FRET-basierter RhoA-Biosensoren hat jedoch auch einen Vorteil gegenüber den bimolekularen Varianten: Für bimolekulare, FRET-basierte Biosensoren müssen zusätzliche Messungen durchgeführt werden, um die Stärke der spektralen Verunreinigungen zu bestimmen, die dann anschließend rechnerisch aus den Biosensor-Bildern entfernt wird (Hodgson *et al.*, 2010). Für unimolekulare Biosensoren sind solche Korrekturen nicht erforderlich, weil die Stöchiometrie der beiden Fluorophore und somit auch der relative Anteil spektraler Verunreinigung an jeder Stelle in der Zelle denselben Wert haben. Der Einfluss spektraler Verunreinigung wird in diesem Fall durch einfache Division des FRET-Bildes durch das Donor-Bild auf den eines konstanten Summanden beschränkt: Das FRET/Donor-Quotientenbild ist dadurch zwar insgesamt heller, als es ohne spektrale Verunreinigung wäre, die absoluten Helligkeitsunterschiede innerhalb des Quotientenbildes bleiben davon jedoch unberührt (Hodgson *et al.*, 2010). Unimolekulare Biosensoren, die neben der RBD auch RhoA enthalten, haben einen weiteren Vorteil: Hier

kann eine hohe Spezifität der intramolekularen Bindung zwischen Biosensor-RBD und Biosensor-RhoA erwartet werden, weil diese entropisch begünstigt ist. Bei vergleichbaren unimolekularen Biosensoren, die selbst kein RhoA enthalten (Abbildung 1.4.A und B), kann dagegen nicht differenziert werden, ob die RBD aktives endogenes RhoA, RhoB oder RhoC bindet (Ren *et al.*, 1999).

Die Verwendung von RhoA-Aktivitäts-Biosensoren macht Informationen über die Aktivitätsverteilung von RhoA in individuellen, sogar lebenden Zellen sichtbar. Die maximal mögliche räumliche Auflösung der Information wird dabei durch die Auflösung und das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis der gesammelten Bilder bestimmt, sie kann also im Sub-Mikrometer-Bereich liegen. Auch die zeitliche Auflösung von Aktivitätsänderungen ist im Vergleich zu RhoA-Aktivitäts-Pulldowns wesentlich höher: Sie liegt im Bereich von Sekunden, für schnelle Aufnahmesysteme sogar darunter. Machacek *et al.* berichteten, dass die Aktivitäten von RhoA, Rac1 und Cdc42 räumlich und zeitlich eng koordiniert werden, sowohl untereinander, als auch mit der Bildung und Expansion von Membranausstülpungen (Machacek *et al.*, 2009). Erstmals wurde berichtet, dass sogar die Diffusionsrichtung aktivierter GTPasen in Zellen mithilfe von Aktivitäts-Biosensoren gemessen wurde (Hinde *et al.*, 2013). Dennoch stellt die Expression eines RhoA-Aktivitäts-Biosensors einen empfindlichen Eingriff in das normale Signalnetzwerk einer Zelle dar. So sind bei dieser vergleichsweise jungen Methode noch viele Fragen ungeklärt: Kann die RBD des RhoA-Effektors Rhotekin auch dann an aktives RhoA binden, wenn der zelluläre Kontext die Bindung eines anderen Effektors begünstigt? Ist die Regulation von exogenem RhoA, das eine intramolekulare Bindung zu einer Effektor-Domäne eingehen kann, tatsächlich mit der endogenen RhoAs identisch? Gibt es neben dem Aktivitätsstatus von RhoA noch andere Einflüsse in der Zelle, die die Fluoreszenz des Biosensors verändern? Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit sollen zur Klärung solcher Fragen beitragen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der multifunktionalen kleinen GTPase RhoA untersucht werden. Dabei sollten zwei verschiedene Aspekte dieser Regulation berücksichtigt werden:

Der erste Aspekt war die biologisch relevante Regulation von RhoA. Diese verdient im Zusammenhang der HGF-induzierten Migration der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 weitere Aufklärung. Zunächst sollte mittels RhoA-Aktivitäts-Pulldowns geprüft werden, welche Änderungen in Gesamt-Aktivität und –Menge von RhoA durch HGF-Behandlung induziert werden. Insbesondere sollte durch siRNA-vermittelte Depletion eine mögliche Rolle des Rho-GAPs p190A in der Regulation der RhoA-Aktivität in diesem Prozess untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten Strategien entwickelt werden, die Stärke der Bewegung lebender Zellen anhand von Phasenkontrast-Zeitraffer-Filmen automatisiert zu quantifizieren.

Der zweite zu untersuchende Aspekt war der Einfluss der endogenen RhoA-Regulation auf zellbiologische Untersuchungsmethoden. Gegenstand dieser Studie war ein FRET-basierter RhoA-Aktivitäts-Biosensor, dessen Signal nach allgemeinem Verständnis durch den Nukleotid-Bindungszustand seines RhoA-Teils bestimmt wird. Es sollte überprüft werden, inwiefern sonstige zelluläre Regulationsprozesse in lebenden Zellen – in Form von Lokalisation, kovalenter Modifikation sowie Interaktion mit endogenen Bindungspartnern – das Signal des Biosensors beeinflussen. Dazu sollten zunächst verschiedene Regulations-relevante Mutationen in den Biosensor eingeführt werden. Die Auswirkung der Mutationen sollten durch fluoreszenz-mikroskopische Messungen der FRET-stimulierten Akzeptor-Emission untersucht und die Ergebnisse dann durch ergänzende Methoden verifiziert werden.

2 Material

2.1 Zelllinien

Tabelle 2.1 gibt die verwendeten Zelllinien, ihre Herkunft und die Bezugsquellen an.

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle
A549	humanes Lungenkarzinom (Giard <i>et al.</i> , 1973)	Prof. Dr. Verena Jendrossek (Universitätsklinikum Essen, Institut für Zellbiologie)
MDCK	canines Nierenepithel (Gaush <i>et al.</i> , 1966)	Dr. Nachiket Vartak (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Abteilung für systemische Zellbiologie)

2.2 *E. coli*-Stämme

Tabelle 2.2 gibt die verwendeten *E. coli*-Stämme und ihren jeweiligen Genotyp an.

Tabelle 2.2: Verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp
DH5 α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ - (Grant <i>et al.</i> , 1990)
BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ (DE3) pLysS(cm ^R) (Studier und Moffatt, 1986)

2.3 Plasmid-DNAs

Tabelle 2.3 gibt die verwendeten Plasmid-DNAs, ihren Aufbau und jeweilige Herkunft an.

Tabelle 2.3: Verwendete Plasmid-DNAs.

Bezeichnung	Aufbau	Herkunft
WT-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP- RhoA	Prof. Dr. Klaus Michael Hahn (University of North Carolina, Department of Pharmacology) (Pertz <i>et al.</i> , 2006)

Q63L-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[Q63L]	diese Arbeit, obwohl zu jenem Zeitpunkt auch erhältlich bei Addgene; jetzt nicht mehr erhältlich (Pertz <i>et al.</i> , 2006)
T19N-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[T19N]	Addgene Plasmid #12152; jetzt nicht mehr erhältlich (Pertz <i>et al.</i> , 2006)
Δ RBD-Biosensor	pTriEx4-CFP-YFP-RhoA	diese Arbeit
Δ RBD-Q63L-Biosensor	pTriEx4-CFP-YFP-RhoA[Q63L]	diese Arbeit
Δ RBD-T19N-Biosensor	pTriEx4-CFP-YFP-RhoA[T19N]	diese Arbeit
Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor	pTriEx4-CFP-YFP	diese Arbeit
Δ RBD-R68E-Biosensor	pTriEx4-CFP-YFP-RhoA[R68E]	diese Arbeit
Δ RBD-Q63L-R68E-Biosensor	pTriEx4-CFP-YFP-RhoA[Q63L,R68E]	diese Arbeit
Δ 190-3-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[Δ 190-193]	diese Arbeit
Q63L- Δ 190-3-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[Q63L, Δ 190-193]	diese Arbeit
T19N- Δ 190-3-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[T19N, Δ 190-193]	diese Arbeit
cerul-Biosensor	pTriEx4-RBD-cerulean-YFP-RhoA	diese Arbeit
cerul-Q63L-Biosensor	pTriEx4-RBD-cerulean-YFP-RhoA[Q63L]	diese Arbeit
Δ RBD-cerul-Biosensor	pTriEx4-cerulean-YFP-RhoA	diese Arbeit
S188A-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[S188A]	diese Arbeit
S188E-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[S188E]	diese Arbeit

Q63L-S188A-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[Q63L,S188A]	diese Arbeit
Q63L-S188E-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[Q63L,S188E]	diese Arbeit
R68E-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[R68E]	diese Arbeit
Q63L-R68E-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[Q63L,R68E]	diese Arbeit
T19N-R68E-Biosensor	pTriEx4-RBD-CFP-YFP-RhoA[T19N,R68E]	diese Arbeit
Raichu-RhoA	pCAGGS-YFP-RBD-RhoA-CFP-K-Ras-CAAX 1237X	Dr. Michiyuki Matsuda (Kyoto University) (Yoshizaki <i>et al.</i> , 2003)
mCherry-RBD	delCMV-mCherry-RBD in Vektor pEGFP-Actin (Clontech)	Abram Calderon (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Abteilung für systemische Zellbiologie); delCMV: (Watanabe und Mitchison, 2002)
CFP-RhoA	pcDNA3.1-CFP-RhoA	diese Arbeit
GST-RBD	pGEX-2T-GST-RBD	(Pellegrin und Mellor, 2008)

2.4 Oligonukleotide

2.4.1 siRNAs

siRNAs wurden von Qiagen bezogen. Tabelle 2.4 gibt die verwendeten siRNAs, die zugehörigen Artikelnummern zur eindeutigen Zuordnung, die jeweilige Ziel-mRNA und, soweit durch Qiagen angegeben, ihre Sequenz an.

Tabelle 2.4: Verwendete siRNAs.

Bezeichnung	Artikelnr.	Ziel-mRNA	Ziel-Sequenz
siGRLF1#1	SI00064407	p190A	AAGGTGTTGAGCGGTACATTA
siGRLF1#2	SI00064414	p190A	CACCACCGAAGAGGTGTTTAA
siGRLF1#3	SI00064421	p190A	CAAGGTTTCCATCGTGAGCAA
siGRLF1#4	SI00064428	p190A	CTCAGCGAGATCCAATGTAAA

siGRLF1#7	SI02664025	p190A	CAGGATGTTCTGGGAGAGGAA
siRhoA#6	SI02654211	RhoA	TTCGGAATGATGAGCACACAA
siRhoA#8	SI02776907	RhoA	TACCTTATAGTTACTGTGTAA
nt-siRNA	1027280	keine	nicht angegeben

2.4.2 DNA-Oligomere zur Klonierung

DNA-Oligomere zur Klonierung wurden von Eurofins MWG Operon bezogen. Tabelle 2.5 gibt die zur Klonierung verwendeten Oligomere, ihren genaueren Verwendungszweck und ihre Sequenz an. Benötigte Restriktionsschnittstellen in den Sequenzen sind unterstrichen.

Tabelle 2.5: Zur Klonierung verwendete DNA-Oligomere. Benötigte Restriktionsschnittstellen in den Sequenzen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Klonierung von	Sequenz 5' → 3'
BS_RBD_TOPO_fwd	<u>NcoI</u> -RBD-CFP- <u>NotI</u> aus RhoA-Biosensor in TOPO	AT <u>ACCATGGC</u> CACACCATCACC
BS_RBD_TOPO_rev		ATAG <u>CGGCCG</u> CAGATCCACCT
BS_RhoA_TOPO_fwd	Δ190-3-Biosensor	ATCAGCTATTCTACTAAAGGTGGT
BS_RhoA_TOPO_rev	<u>NotI</u> -YFP-RhoA- <u>XhoI</u> aus RhoA-Biosensor in TOPO	AGTGG
		TAT <u>CTCGAGT</u> TATCACAAGACAA GGCAAC
ΔRBD_fwd	ΔRBD-Biosensor	AG <u>ACCATGGT</u> GAGCAAGGGCGAG GAG
ΔRBD_rev		ACACGATAG <u>CGGCCG</u> CAGATCCA CCT
ΔRhoA_fwd	ΔRhoA-Biosensor	ATAG <u>CGGCCG</u> CTATGGTGAGCAA GGCGA
ΔRhoA_rev		GCG <u>CTCGAGT</u> TACTTGTACAGCTC GTCCATGCC
RhoA_Δ190-3_rev	Δ190-3-Biosensor	TAC <u>CTCGAGT</u> CAACCAGATTTTTT CTTCC

2.4.3 DNA-Oligomere zur Mutagenese

DNA-Oligomere zur Mutagenese wurden von Eurofins MWG Operon bezogen. Tabelle 2.6 gibt die zur Mutagenese verwendeten Oligomere, die einzuführende Mutation und ihre Sequenz an. Die mutierten Basen sind unterstrichen.

Tabelle 2.6: Zur Mutagenese verwendete DNA-Oligomere. Mutierte Basen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Mutation	Sequenz 5' → 3'
CFP_H148D_fwd	H148D in CFP	GGAGTACAAC <u>T</u> ACATCAGC <u>G</u> ACAACG TCTATATCACCG
CFP_H148D_rev		CGGTGATATAGACGTTGT <u>C</u> GCTGATGT AGTTGTACTCC
CFP_S72A_fwd	S72A in CFP	GCGTGCACTGCTTC <u>G</u> CCCGCTACCCCG ACC
CFP_S72A_rev		GGTCGGGGTAGCGGG <u>C</u> GAAGCACTGC ACGC
CFP_Y145A_H148D_fwd	Y145A in CFP[H148D]	GCACAAGCTGGAGTACAAC <u>G</u> CCATCA GCGACAACGTC
CFP_Y145A_H148D_rev		GACGTTGTCGCTGATG <u>G</u> CGTTGTACTC CAGCTTGTGC
RhoA_S188A_fwd	S188A in RhoA	GACGTGGGAAGAAAAA <u>A</u> GCTGGTTGC CTTGTCTTGTG
RhoA_S188A_rev		CACAAGACAAGGCAACCAG <u>C</u> TTTTTTC TTCCACGTC
RhoA_S188E_fwd	S188E in RhoA	CAAGCTAGACGTGGGAAGAAAAA <u>A</u> <u>A</u> GGTTGCCTTGTCTTGTG
RhoA_S188E_rev		CACAAGACAAGGCAACCT <u>T</u> CTTTTTTC TTCCACGTCTAGCTTG
RhoA_R68E_fwd	R68E in RhoA	GGAAGATTATGAT <u>G</u> AGCTGAGGCCCT CTCCTACCCAG
RhoA_R68E_rev		CTGGGTAGGAGAGGGGCCTCAG <u>C</u> TCA TCATAATCTTCC

2.4.4 DNA-Oligomere für qPCR

DNA-Oligomere zur Quantifizierung von p190A-cDNA mittels qPCR wurden mithilfe der Primer-BLAST-Funktion des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ausgewählt und von Eurofins MWG Operon bezogen. DNA-Oligomere zur Quantifizierung von Referenz-cDNAs mittels qPCR wurden von Qiagen bezogen. Tabelle 2.7 gibt für jede mittels qPCR untersuchte Ziel-cDNA je nach Bezugsquelle die Sequenzen oder die Artikelnummern der verwendeten DNA-Oligomere an.

Tabelle 2.7: Zur qPCR verwendete DNA-Oligomere.

Ziel-cDNA	Artikelnummer bzw. Sequenzen 5' → 3'
p190A	ACCCCTGGTCCCGTATAAC und CCTCCTTAAGGGCATGCAAC
GAPDH	QT01192646
β-Actin	QT01680476
β-2-Microglobulin	QT00088935

2.4.5 DNA-Oligomere zur Sequenzierung

Die Sequenz von Plasmid-DNAs wurde mittels Sequenzierung durch GATC Biotech verifiziert. Soweit möglich, wurden dafür die Standard-Primer „T7minus1“, „RPC“ und „Topo-2“ von GATC Biotech verwendet. Weitere für die Sequenzierung benötigte DNA-Oligomere wurden von Eurofins MWG Operon bezogen. Tabelle 2.8 gibt diese Oligomere, ihre Verwendung und ihre Sequenz an. Der Primer „ForRhoA“ wurde von Johannes Koch entworfen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.8: Zur Sequenzierung verwendete DNA-Oligomere.

Bezeichnung	Sequenzierung von	Sequenz 5' → 3'
RhoBS_rev	RhoA-Biosensor	CCTGCACCTGAGGTTAATC
Raichu_fwd	Raichu-RhoA	CTAACCATGTTTCATGCC
RhoA_rev		TTCTAAACTATCAGGGCTG
ForRhoA		CCGGTGAAACCTGAAGAAG

2.5 Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, in Reinstwasser angesetzt. Die Bezeichnung H₂O meint in dieser Arbeit ebenfalls Reinstwasser.

2.5.1 Puffer für Arbeiten mit DNA

Tabelle 2.9 gibt die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer für Arbeiten mit DNA an.

Tabelle 2.9: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer für Arbeiten mit DNA.

Puffer	Zusammensetzung
DNA-Probenpuffer	30% (v/v) Glycerin
	0,25% (w/v) Bromphenolblau
	0,325% (w/v) Xylencyanol
TAE	40 mM Tris-Acetat pH 8,3
	1 mM EDTA

2.5.2 Medien für mikrobiologische Arbeiten

Tabelle 2.10 gibt die Zusammensetzungen der verwendeten Medien für mikrobiologische Arbeiten an.

Tabelle 2.10: Zusammensetzungen der verwendeten Medien für mikrobiologische Arbeiten.

Medium	Zusammensetzung
LB-Agar	0,5% (w/v) Hefeextrakt
	1% (w/v) Trypton
	1% (w/v) NaCl
	1,5% (w/v) Agar
	pH 7,4
LB-Medium	0,5% (w/v) Hefeextrakt
	1% (w/v) Trypton
	1% (w/v) NaCl
	pH 7,4

2.5.3 Puffer, Lösungen und Medien für zellbiologische Arbeiten

Tabelle 2.11 gibt die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien für zellbiologische Arbeiten an.

Tabelle 2.11: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien für zellbiologische Arbeiten.

Bezeichnung	Zusammensetzung
DPBS	0,02% (w/v) KCl 0,02% (w/v) KH ₂ PO ₄ 0,8% (w/v) NaCl 0,115% (w/v) Na ₂ HPO ₄ (PAN Biotech)
Kulturmedium	10% (v/v) FCS je 100 U/mL Penicillin/Streptomycin in DMEM high glucose mit Natriumpyruvat, GlutaMAX, Phenolrot (Life Technologies, Gibco)
Mikroskopie-Medium	10% (v/v) FCS je 100 U/mL Penicillin/Streptomycin in DMEM high glucose mit L-Glutamin, HEPES; ohne Natriumpyruvat, Phenolrot (Life Technologies, Gibco)
Opti-MEM	mit L-Glutamin; ohne Phenolrot (Life Technologies, Gibco)
Serummangel-Medium	0,2% (v/v) FCS je 100 U/mL Penicillin/Streptomycin in DMEM high glucose mit Natriumpyruvat, GlutaMAX, Phenolrot (Life Technologies, Gibco)
Tranfektionsmedium	10% (v/v) FCS in DMEM high glucose mit Natriumpyruvat, GlutaMAX, Phenolrot (Life Technologies, Gibco)
Trypsin	0,05% (w/v) Trypsin) 0,02% (w/v) EDTA mit Phenolrot in PBS (PAN Biotech)

2.5.4 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tabelle 2.12 gibt die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese an.

Tabelle 2.12: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Zusammensetzung
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 1% (v/v) IGEPAL CA-630 0,25% (v/v) Na-deoxycholat 1 mM EDTA unmittelbar vor Anwendung zugesetzt: 1 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 14,3% (v/v) 7x Protease-Inhibitor
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris 2 M Glycin 1% (w/v) SDS
5x SDS-Probenpuffer	500 mM Tris-HCl pH 6,8 50% (v/v) Glycerin 10% (w/v) SDS Bromphenolblau DTE

2.5.5 Puffer und Lösungen für Western Blots

Tabelle 2.13 gibt die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen für Western Blots an.

Tabelle 2.13: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen für Western Blots.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anodenpuffer I	300 mM Tris-HCl pH 10,4 10% (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris-HCl pH 10,4 10% (v/v) Methanol

Blockier-Lösung	0,02 mM Tris-HCl pH 7,6 13,7 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween 20 5% (w/v) Milchpulver
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCl pH 10,4 40 mM 6-Amino-Hexansäure 10% (v/v) Methanol
Ponceau S-Gebrauchslösung	10% Ponceau S-Stammlösung 1% (v/v) Essigsäure
Ponceau S-Stammlösung	2% (w/v) Ponceau S 30% (w/v) Trichloressigsäure 30% (w/v) 5-Sulfosalicylsäure
TBS	0,02 mM Tris-HCl pH 7,6 13,7 mM NaCl
TBS-T	0,02 mM Tris-HCl pH 7,6 13,7 mM NaCl 0,1% (v/v) Tween 20

2.5.6 zusätzliche Puffer und Lösungen zur Beschichtung von Sepharose und für RhoA-Aktivitäts-Pulldowns

Tabelle 2.14 gibt die Zusammensetzungen der verwendeten zusätzlichen Puffer und Lösungen zur Beschichtung von Sepharose und für RhoA-Aktivitäts-Pulldowns an.

Tabelle 2.14: Zusammensetzungen der verwendeten zusätzlichen Puffer und Lösungen zur Beschichtung von Sepharose und für RhoA-Aktivitäts-Pulldowns.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coomassie-Entfärbelösung	45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,25% (w/v) Coomassie Brillantblau R-250 45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
Pulldown-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,2 1% (v/v) Triton X-100 500 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O

	0,1% (w/v) SDS unmittelbar vor Anwendung zugesetzt: 200 µM PMSF 14,3% (v/v) 7x Protease-Inhibitor 10 µg/mL Aprotinin 10 µg/mL Leupeptin
Pulldown-TBS	50 mM Tris-HCl pH 7,6 140 mM NaCl
Pulldown-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,2 1% (v/v) Triton X-100 150 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O unmittelbar vor Anwendung zugesetzt: 200 µM PMSF 14,3 % (v/v) 7x Protease-Inhibitor 10 µg/mL Aprotinin 10 µg/mL Leupeptin
2x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8 2% (w/v) SDS 10% (v/v) Glycerin 40 mM DTT 0,01% (w/v) Bromphenolblau
4x SDS-Probenpuffer	500 mM Tris-HCl pH 6,8 4% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerin 40 mM DTT 0,02% (w/v) Bromphenolblau
Sepharose-Lagerpuffer	90% (v/v) Sepharose-Waschpuffer 10% (v/v) Glycerin
Sepharose-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 1% (v/v) Triton X-100 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O unmittelbar vor Anwendung zugesetzt:

	1 mM DTT 200 µM PMSF 10 µg/mL Aprotinin 10 µg/mL Leupeptin
Sepharose-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 0,5% (v/v) Triton X-100 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O unmittelbar vor Anwendung zugesetzt: 1 mM DTT 200 µM PMSF 10 µg/mL Aprotinin 10 µg/mL Leupeptin

2.6 Chemikalien

Basischemikalien wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Fisher Scientific, Fluka, Roth, Sigma-Aldrich, VWR und Waldeck bezogen. In Tabelle 2.15 sind sonstige Chemikalien, Bezugsquellen und, wo erforderlich, genauere Spezifikationen aufgeführt.

Tabelle 2.15: Verwendete Chemikalien.

Substanz	Bezugsquelle	Spezifikation
Acrylamid-Mix	Roth	Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)
Agar	Roth	Agar-Agar, Kobe I
Agarose	Biozym	SeaKem LE Agarose
6-Amino-hexansäure	Roth	
Ampicillin-Natriumsalz	Roth	
Aprotinin	Roche	
Bromphenolblau	Serva	
BSA	Sigma-Aldrich	
Chloramphenicol	Roth	
Coomassie Brilliantblau R-250	Serva	
DTE	Roth	
DTT	Roth	
EDTA	AppliChem	

Ethidiumbromid	Roth	1%
FCS	PAN Biotech; Life Technologies (Gibco)	lot P291006 lot 41A1312K
Glycerin	AppliChem	87%
Glycin	AppliChem	
Hefeextrakt	Serva	Servabacter
HGF	Sigma-Aldrich	rekombinant, exprimiert in <i>Baculovirus</i> -infizierten High-5-Zellen
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich	
IPTG	Sigma-Aldrich	
Kanamycinsulfat	Roth	
Leupeptin	Roche	
Lipofectamine 2000	Life Technologies (Invitrogen)	
Milchpulver	Roth	
Na-deoxycholat	Sigma-Aldrich	
Nukleotid-Mix	Roth	Roti-Mix PCR3
Oligo-dT-Primer	Life Technologies (Invitrogen)	
OxyFluor	Oxyrase	
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies (Gibco)	je 10000 U/mL
PMSF	Roche	
Ponceau S	Roth	
7x Protease-Inhibitor	Roche	complete Mini, EDTA-frei
RNaseOUT	Life Technologies (Invitrogen)	
SDS	Roth	
5-Sulfosalicylsäure	Fluka	
TEMED	Roth	
Tris	AppliChem	
Triton X-100	Sigma-Aldrich	
Trypton	Serva	aus Casein
Tween 20	Roth	
X-gal	peqlab	
Xylencyanol	Roth	

2.7 Reagenziensätze

In Tabelle 2.16 sind die verwendeten Reagenziensätze mit jeweiliger Bezugsquelle aufgeführt.

Tabelle 2.16: Verwendete Reagenziensätze.

Anwendung	Bezeichnung	Bezugsquelle
DNA-Transfektion	Effectene	Qiagen
Gel-Extraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
HRP-Detektion	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific (Pierce)
PCR-Aufreinigung	QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Plasmid-Minipräparation	GenElute HP Plasmid Miniprep Kit; QIAprep Spin Miniprep Kit	Sigma-Aldrich; Qiagen
RNA-Isolation	Rneasy Mini Kit	Qiagen
TOPO-Klonierung	TOPO TA Cloning Kit pCR2.1 One-Shot DH5α	Life Technologies (Invitrogen)

2.8 Protein- und Nukleinsäure-Standards

In Tabelle 2.17 sind die verwendeten Protein- und Nukleinsäure-Standards mit jeweiliger Bezugsquelle aufgeführt.

Tabelle 2.17: Verwendete Protein- und Nukleinsäure-Standards.

Standard	Bezeichnung	Bezugsquelle
Bradford	Protein-Assay Dye Reagent	BioRad
DNA	my-Budget 1 kb DNA-Leiter; SLL 100 BP	BioBudget; Roth
Protein	Page Ruler prestained; Spectra Multicolor Broad Range; Roti-Mark Standard	Thermo Scientific (Fermentas); Thermo Scientific (Fermentas); Roth

2.9 Antikörper

In Tabelle 2.18 sind die verwendeten Antikörper mit jeweiliger Bezugsquelle aufgeführt.

Tabelle 2.18: Verwendete Antikörper.

Spezifität	Bezeichnung	Bezugsquelle
Maus-anti-p190A	IgG1	BD Transduction Laboratories
Maus-anti-RhoA	monoklonal	Cytoskeleton
Maus-anti- α -Tubulin	IgG1 monoklonal	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Maus-HRP	IgG-HRP	Santa Cruz

2.10 Enzyme und Proteine

In Tabelle 2.19 sind die verwendeten Enzyme und Proteine mit jeweiliger Bezugsquelle aufgeführt.

Tabelle 2.19: Verwendete Enzyme und Proteine.

Funktion	Bezeichnung	Bezugsquelle
DNase	RNase-free DNase Set	Qiagen
DNA-Ligase	T4 DNA Ligase 50 μ L	New England Biolabs
DNA-Polymerase	my-Budget Pfu DNA-Polymerase 500 U; Pfu Turbo DNA-Polymerase 100 U; MB Taq hot-start	Bio-Budget; Agilent Technologies; minerva biolabs
fluoreszierendes Protein	CFP; YFP	BioVision
qPCR-Mix	Fast SYBR Green Master Mix	Life Technologies (Applied Biosystems)
Restriktionsenzyme	diverse	New England Biolabs

2.11 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 2.20 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit jeweiligen Bezugsquellen aufgeführt.

Tabelle 2.20: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Cryoröhrchen	PP, 2 mL, mit Innengewinde	Roth
Deckgläschen	13 mm, #1,5	Thermo Scientific
GELoader-Spitzen		Eppendorf

Glasbodenschalen	35 mm, 14 mm Microwell, No. 1.5 coverglass	MatTek
Glutathion-Sepharose	4B	GE Healthcare
Küvetten	PS Halbmikroküvetten	Sarstedt
Kulturröhrchen	Cultubes, 14 mL	Simport
Kulturschalen mit ibidi-Standardboden	35 mm, hoch	ibidi
Parafilm	M	Bemis
PCR-Eppis	0,2 mL mit flachem Deckel	Thermo Scientific
Pipetten-Spitzen		Sarstedt, Greiner
Plattierungsspatel		VWR
PVDF-Membran		Thermo Scientific
qPCR-Deckel	MicroAmp Optical 8-cap-Strip	Life Technologies (Applied Biosystems)
qPCR-Platten	MicroAmp Fast Optical 96-Well (0,1 mL)	Life Technologies (Applied Biosystems)
Reaktionsgefäß	0,5 mL, 1,5 mL und 2 mL Safe-Lock-Tubes; 15 mL und 50 mL, PP	Eppendorf; Sarstedt
RNA-Lysat- Homogenisator-Säulen	QIAshredder	Qiagen
Sterilfilter	Filtropur, 0,2 µm Porengröße	Sarstedt
Zellkulturplatten	6-Loch und 24-Loch	Greiner
Zellkulturschalen	10 cm	Sarstedt

2.12 Geräte

In Tabelle 2.21 sind die verwendeten Geräte mit jeweiligen Herstellern aufgeführt. Die verwendeten Mikroskop-Systeme sind separat in Abschnitt 2.13 aufgeführt.

Tabelle 2.21: Verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpen	KNF laboport; Vacusafe comfort	Neolab; Integra Biosciences
Horizontale DNA- Gelelektrophoresekammer	MIDI-1 HU10	Roth
Feinwaage	PCB 200-3B	Kern
Geldokumentations- Einheiten	Fusion FX7; Universal Hood	Peqlab; Biorad
Heizblock	TH26	HLC BioTech
Inkubator	Function Line	Thermo Scientific (Heraeus)
Kryocontainer		Nalgene
Magnetrührwerk	CB161	stuart
Mikrozentrifugen	Mikro 120; IR	Hettich; Roth
Nanodrop	ND-100	Peqlab
PCR-Zykler	MultiGene gradient	Labnet International
pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo
Photometer	Genesys6	Thermo Scientific
Pipetten	Automatic-Sarpette; Research Pipette 2,5/10/20/100/200/1000 µL	Sarstedt; Eppendorf
qPCR-Zykler	StepOnePlus	Life Technologies (Applied Biosystems)
Reinstwasseranlage	Milli-Q-System	Millipore
Rotator		VWR
Schüttelinkubator	Barnstead Lab-Line MaxQ 4000	Thermo Scientific
SDS-PAGE-Kammer	Mini PROTEAN Tetra Cell	BioRad
Spannungsgeber	EV231, EV243 und EV 265	Consort

Sterilwerkbank	Hera safe	Thermo Electron Corporation
Ultraschall-Homogenisator	Sonopuls HD2070 mit Mikrospitze MS73	Bandelin
UV-Transilluminator		Faust
Vortexer	PV-1	Grant-bio
Wasserbad	Aqualine AL18	Lauda
Western Blot-Kammer	Fastblot B34	Biometra
Wippschüttler		VWR
Zählkammer	Neubauer improved, 0,0025 mm ²	Roth
Zellkultur-Inkubator	Forma Direct Heat Hepa Class 100	Thermo Scientific
Zentrifugen	Avanti J-E mit Festwinkelrotor JLA-9.1000; 5415 D und 5810 R mit Ausschwingrotoren A-2-DWP, A-4-44 und A-4-81 sowie Festwinkelrotor F-34-6-38	Beckman Coulter; Eppendorf

2.13 Mikroskope

In den Tabellen 2.22 bis 2.25 sind die technischen Spezifikationen der verwendeten Mikroskopsysteme aufgeführt. Der Hersteller einzelner Komponenten wird dabei jeweils nur dann separat angegeben, wenn diese nicht vom Hersteller des Mikroskops selbst stammten.

Tabelle 2.22: Nikon-System für Phasenkontrast-Aufnahmen.

Komponente	Modell (Hersteller)
Mikroskop	invertiertes Mikroskop Eclipse Ti-E
Software	NIS-Elements, Version: AR 3.2
Objektiv	S Plan Fluor ELWD 20x DIC N1; NA: 0,45
Lampe	TI-PS100W
Kamera	CoolSNAP HQ2, 1394, 14-bit, 220 V, mit Sony CCD (Roper Scientific)
Filterwechsler	Lambda 10-2 RS232 (Sutter Instruments)

Tabelle 2.23: Leica-System für konfokale Laser-Raster-Fluoreszenz-Aufnahmen.

Komponente	Modell (Hersteller)
Mikroskop	konfokales Laser-Raster-Mikroskop TCS SP5, basiert auf invertiertem Mikroskop DMI6000B
Software	Leica Application Suite Advanced Fluorescence “LAS AF”, Version: 2.6.3.8173
Objektiv	HCX PL APO lambda blue 63,0xOIL UV; NA: 1,40
Laser	Argon, 458 und 514 nm Helium-Neon, 594 nm
Detektoren	Photovervielfacher-Röhren (PMTs, konstante Komponente des TCS SP5)

Tabelle 2.24: Nikon-System für Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Aufnahmen.

Komponente	Modell (Hersteller)
Mikroskop	invertiertes Mikroskop Eclipse Ti-E
Software	Andor IQ, Version 2.5.1 (Andor)
Objektiv	Apo TIRF 100xOIL; NA 1,49
TIRF-Laser	LD-R488-50A(S); DPSS Laser CW 488 nm; 50 mW (Andor) LD-R561-50D; DPSS Laser CW 561 nm; 50 mW (Andor)
Laser-Modulator	LC-501 Revolution 500series (Andor)
TIRF-Strahlteiler	zt 491 RDCXT zt 561 RDCXT
Epifluoreszenz-Lampe	Intensilight C-HGFIE (Nikon)
Epifluoreszenz-Filter	TR-R512-630 Semrock BrightLine Multiband Bandpass Filter (Andor)
Kamera	DR-328G-C01-SIL Clara (Andor)

Tabelle 2.25: Olympus/PicoQuant-System für Fluoreszenz-Lebensdauer-Aufnahmen.

Komponente	Modell (Hersteller)
Mikroskop	invertiertes konfokales Laser-Raster-Mikroskop Fluoview FV1000
Objektiv	UPlasSApo 60x Oil; NA: 1,35
Konfokal-Ausstattung:	
Software	FV-10 ASW 1.7, Version: 1.7.3.0
Laser	Argon, 458 und 515 nm (Melles Griot)
Anregungsfilter	DM458/515
Emissionsfilter	DM510 zur Trennung von CFP- und YFP-Emission
Detektor	PMT
FLIM-Ausstattung:	
Software	SymPho Time, Version: 5.3.2.2 (PicoQuant)
Laser	Diode, 440 nm, Pulsbreite 70 ps (PicoQuant) mit Steuereinheit PDL828 Sepia II (PicoQuant)
Anregungsfilter	DM440/530
Emissionsfilter	HQ480/20
Detektor	Einzelphotonen-Lawinendiode PDM-Serie (Micro Photon Devices) mit zeitkorreliertem Einzelphotonenzähl-Modul PicoHarp 300 (PicoQuant)

2.14 Softwares

Tabelle 2.26 gibt die Softwares an, die neben den üblichen Softwares sowie den Anwendungs-Softwares der aufgeführten Geräte genutzt wurden.

Tabelle 2.26: Genutzte Softwares. Nicht aufgeführt sind übliche Softwares und Anwendungs-Softwares aufgeführter Geräte.

Software	Hersteller	Verwendung
ImageJ	http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html	Bildbearbeitung
PureDenoise	Luisier <i>et al.</i> , 2011	ImageJ-Makro, SNR-Verbesserung
IgorPro v5.3.2.2	WaveMetrics	Auswertung von FLIM-Daten
pFLIM	Walther <i>et al.</i> , 2011	IgorPro-Makro, Auswertung von FLIM-Daten

3 Methoden

3.1 Arbeiten zur Generierung/Modifikation von DNA-Konstrukten

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wurde zur gezielten Amplifikation von DNA-Sequenzen angewandt (Mullis und Faloona, 1987). Bei der PCR wird ein DNA-Templat, das die zu amplifizierende Sequenz enthält, unter geeigneten Pufferbedingungen mit allen Komponenten versetzt, die zur *in vitro*-Synthese von DNA erforderlich sind. Diese weiteren Komponenten sind eine DNA-Polymerase, die vier Desoxyribonukleotriphosphate (dNTPs) als Substrate für die neu zu synthetisierende DNA sowie Oligonukleotide, im Folgenden als Primer bezeichnet, die den Beginn der Synthese ermöglichen und gleichzeitig bestimmen, welcher Teil des Templates amplifiziert wird. Bei den Primern handelt es sich um zwei kurze, einzelsträngige DNA-Fragmente, deren Sequenz so gewählt wird, dass ihre 3'-Enden an den entgegengesetzten Enden der zu amplifizierenden Sequenz zu den entgegengesetzten Strängen des Templates komplementär sind. Das Reaktionsgemisch wird in einem Thermozykler verschiedenen Temperaturen ausgesetzt, die nacheinander folgende Reaktionen bewirken:

- 1) Das doppelsträngige Template wird zu Einzelsträngen aufgeschmolzen.
- 2) Komplementäre DNA-Sequenzen binden aneinander. Es ist gewünscht, dass das Template dabei nur von Primern gebunden wird, nicht von komplementären Templatesträngen. Daher werden die Primer in hohem Überschuss zugesetzt. Die Temperatur in diesem Schritt wird unter Rücksicht auf Länge und GC-Gehalt der Primer gewählt.
- 3) Die DNA-Polymerase bindet an das 3'-Ende der templategebundenen Primer und verlängert diesen zu einem Strang, der zum Template komplementär ist. Temperatur und Dauer dieses Schrittes werden unter Rücksicht auf die verwendete Polymerase und Länge der zu amplifizierenden Sequenz gewählt. Die in dieser Arbeit verwendete Pfu-Polymerase hat eine optimale Elongationstemperatur von 75 °C und eine Extensionsrate von 500-1000 b/min. Diese Temperaturabfolge wird mehrmals durchlaufen, und in jedem Zyklus erhöht sich die vorliegende Menge an DNA-Molekülen mit der Sequenz, die im Template zwischen den Bindestellen der Primer liegt. Unter optimalen Bedingungen kann sich die Menge dieses PCR-Produktes in jedem Zyklus verdoppeln. Das typische Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 25 µL. Tabelle 3.1a gibt die typische Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes wieder, Tabelle 3.1b den typischen Temperaturverlauf einer PCR.

Tabelle 3.1a: Typische Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes.

Bestandteil	Endkonzentration
10x Pfu-Puffer	1x
dNTP-Mix	0,1 mM je dNTP
Primer 1	1 μ M
Primer 2	1 μ M
Templat	1 ng/ μ L
Pfu-Polymerase	0,05 U/ μ L

Tabelle 3.1b: Typischer Temperaturverlauf einer PCR.

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer	Zyklen
98	15 s	1
98	15 s	5
50	30 s	
75	2 min/kb Fragmentlänge	
98	15 s	25
50	30 s	
75	2 min/kb Fragmentlänge	
75	7 min	1
4	zur kurzfristigen Lagerung	

Nach der PCR wurde das Reaktionsgemisch durch Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5) auf das Vorhandensein des gewünschten Produktes hin überprüft und durch Anfügen von 3'-Adenin-Überhängen (3.1.2) für eine TOPO-Klonierung (3.1.9) vorbereitet oder durch präparativen Restriktionsverdau (3.1.4.2) für eine Ligation (3.1.7) vorbereitet.

3.1.2 Anfügen von 3'-Adenin-Überhängen an DNA-Fragmente

Zur TOPO-Klonierung (3.1.9) werden DNA-Fragmente mit 3'-Adenin-Überhängen benötigt. In dieser Arbeit wurde in der PCR (3.1.1) die Pfu-Polymerase eingesetzt, da diese eine niedrige Fehlerrate hat. Die PCR-Produkte dieser Polymerase tragen allerdings keine 3'-Adenin-Überhänge; diese müssen daher für TOPO-Klonierungen nach der Aufreinigung (3.1.6) nachträglich angefügt werden. Eine typische Reaktion zum Anfügen von 3'-Adenin-Überhängen hatte ein Volumen von 50 μ L. Tabelle 3.2 gibt die typische Zusammensetzung eines solchen Ansatzes wieder.

Tabelle 3.2: Typische Zusammensetzung einer Reaktion zum Anfügen von 3'-Adenin-Überhängen.

Bestandteil	Endkonzentration
PCR-Produkt	33 % (v/v)
10x Taq-Puffer	1x
100 mM MgCl ₂	1,5 mM
dNTP-Mix	0,2 mM pro dNTP
Taq-Polymerase	0,02 U/μL

Der Ansatz wurde für 20 min auf 72 °C erhitzt. Durch den Einsatz des dNTP-Mix lagen im Ansatz auch die hier nicht benötigten Nukleotide dCTP, dGTP und dTTP vor. Dennoch war das Reaktionsprodukt für TOPO-Klonierungen geeignet.

3.1.3 mutagene Polymerase-Kettenreaktion

Gezielte Mutagenese in Plasmiden zur eukaryotischen Expression wurde mittels einer mutagenen PCR erzeugt, die sich von der PCR zur reinen Amplifikation von DNA-Sequenzen (3.1.1) jedoch in folgenden Punkten unterscheidet: Bei der mutagenen PCR wird nicht nur ein Teil des Templats, sondern das gesamte Templat amplifiziert. Um das zu erreichen, sind die Primer in diesem Fall komplementär zueinander, so dass die Amplifikation von der gleichen Stelle des Templats aus in beide Richtungen stattfinden kann und kein Teil des Templats außerhalb des Bereiches zwischen den 5'-Enden der beiden Primer liegt, die sonst durch ihre Lage die Länge des Amplifikats auf einen Teil des Templats begrenzen würden. Die Bindungsstelle der Primer am Templat wird so gewählt, dass sie am Ort der gewünschten Mutation liegt. Die Mutation selbst wird bei Synthese der Primer in deren Sequenz eingefügt. Da jedes Amplifikat durch Verlängerung eines Primers entsteht, trägt demzufolge im Idealfall jedes Amplifikat aus der mutagenen PCR dieselbe, im Voraus vorgegebene Mutation. Die in dieser Arbeit verwendete Pfu Turbo-Polymerase hat eine optimale Elongationstemperatur von 68 °C und eine Extensionsrate von ca. 1 kb/min. Das typische Gesamtvolumen eines mutagenen PCR-Ansatzes betrug 50 μL. Tabelle 3.3a gibt die typische Zusammensetzung eines mutagenen PCR-Ansatzes wieder, Tabelle 3.3b den typischen Temperaturverlauf einer mutagenen PCR.

Tabelle 3.3a: Typische Zusammensetzung eines mutagenen PCR-Ansatzes.

Bestandteil	Endkonzentration
10x Pfu Turbo-Puffer	1x
dNTP-Mix	0,2 mM je dNTP
Primer 1	0,2 μ M
Primer 2	0,2 μ M
Templat	0,2 ng/ μ L
Pfu Turbo-Polymerase	0,05 U/ μ L

Tabelle 3.3b: Typischer Temperaturverlauf einer mutagenen PCR.

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer	Zyklen
98	30 s	1
98	10 s	30
55	1 min	
68	1 min/kb Templatlänge	
68	7 min	1
4	zur kurzfristigen Lagerung	

Nach der mutagenen PCR wurde das Reaktionsgemisch durch Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5) auf das Vorhandensein des gewünschten Produktes hin überprüft und durch Restriktionsverdau mit DpnI (3.1.4.3) für die Transformation in *E. coli* (3.1.8) vorbereitet.

3.1.4 Restriktionsverdau

Plasmide und PCR-Amplifikate wurden nach Bedarf mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Restriktionsendonukleasen schneiden DNA-Doppelstränge an jeweils spezifischen, zumeist palindromischen Erkennungssequenzen. Eventuelle Überhänge, die an den Schnittstellen zurückbleiben, sind charakteristisch für die jeweilige Restriktionsendonuklease. In dieser Arbeit wurden Restriktionsverdaue zu drei verschiedenen Zwecken durchgeführt:

- 1) Analytischer Restriktionsverdau
- 2) Präparativer Restriktionsverdau
- 3) Restriktionsverdau im Rahmen der Mutagenese

3.1.4.1 Analytischer Restriktionsverdau

Eine geringe Menge DNA wurde zur anschließenden Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5) verdaut. Die Größe der entstandenen Fragmente liefert Aufschluss darüber, ob die DNA die erwartete Sequenz haben kann. Ein Ansatz zum analytischen Restriktionsverdau hatte ein typisches Volumen von 10 μL . Tabelle 3.4a gibt die typische Zusammensetzung eines solchen Ansatzes wieder.

Tabelle 3.4a: Typischer Ansatz eines analytischen Restriktionsverdaus.

Bestandteil	Endkonzentration bzw. Menge
10x Puffer	1x
100x BSA (bei Bedarf)	1x
Restriktionsenzyme	je 2 U
DNA	ca. 1 μg

Analytische Restriktionsverdaue wurden 1 h bei 37 °C inkubiert.

3.1.4.2 Präparativer Restriktionsverdau

Einige Mikrogramm DNA wurden zum anschließenden Einsatz in einer Ligation (3.1.7) verdaut. DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen werden mit erhöhter Wahrscheinlichkeit ligiert. So können durch gezielte Kombination von DNA-Fragmenten Plasmide mit der gewünschten Sequenz hergestellt werden.

Ein Ansatz zum präparativen Restriktionsverdau hatte ein typisches Volumen von 20 μL . Tabelle 3.4b gibt die typische Zusammensetzung eines solchen Ansatzes wieder.

Tabelle 3.4b: Typischer Ansatz eines präparativen Restriktionsverdaus.

Bestandteil	Endkonzentration bzw. Menge
10x Puffer	1x
100x BSA (bei Bedarf)	1x
Restriktionsenzyme	je 5 U
DNA	ca. 5 μg

Präparative Restriktionsverdaue wurden 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie aufgereinigt (3.1.6), bei Bedarf mit vorheriger Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5), bevor sie in einer Ligation eingesetzt wurden.

3.1.4.3 Restriktionsverdau im Rahmen der Mutagenese

Verdau des gesamten PCR-Produktes einer mutagenen PCR (3.1.3) mit der Restriktionsendonuklease DpnI. DpnI schneidet ausschließlich methylierte DNA-Stränge. Wird das Produkt einer mutagenen PCR mit DpnI behandelt, werden daher ausschließlich die DNA-Stränge geschnitten, die ursprünglich als unmutiertes Templat eingesetzt wurden: Diese wurden bakteriell synthetisiert und sind daher methyliert. Die DNA-Stränge mit der gewünschten Mutation sind durch PCR entstanden und daher unmethyliert. Sie werden durch die DpnI-Behandlung nicht beeinträchtigt und werden so von den unmutierten Templatmolekülen gereinigt.

Zum Restriktionsverdau mit DpnI wurde einem PCR-Ansatz nach der mutagenen PCR 1 µL DpnI zugegeben und 90 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend in *E. coli* transformiert (3.1.8).

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern DNA-Stücke in einem elektrischen Feld durch ein Agarose-Gel und werden dabei entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Phosphat-Gruppen von DNA-Molekülen sind negativ geladen, daher wandert DNA im elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Kathode. Das Agarose-Gel schränkt die Beweglichkeit der Moleküle jedoch ein, so dass große DNA-Stücke langsamer wandern als kleine. Diese Methode wurde genutzt, um nach einer PCR (3.1.1) oder qPCR (3.2.8) zu prüfen, ob in der Reaktion Produkt gebildet wurde und ob dieses die gewünschte Größe hatte. Außerdem wurde sie eingesetzt, um nach einem analytischen Restriktionsverdau (3.1.4.1) die Größe der entstandenen DNA-Fragmente beurteilen zu können, sowie um nach einem präparativen Restriktionsverdau (3.1.4.2) das benötigte DNA-Fragment von DNA-Fragmenten anderer Größe zu trennen.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in Gelen mit einem Agarose-Gehalt von 1,2% (w/v) in TAE durchgeführt. Nur zur Analyse von qPCR-Produkten wurden Gele mit einem erhöhten Agarose-Gehalt von 3% verwendet, da diese kleine DNA-Fragmente, wie sie bei der qPCR gebildet werden, besser auftrennen. Zur späteren Visualisierung der DNA enthielten die Gele außerdem Ethidiumbromid. Dieses bildet mit doppelsträngiger DNA einen fluoreszierenden Komplex, der durch Bestrahlung mit UV-Licht angeregt wird (LePecq und Paoletti, 1967). Die aufgetragenen Probenvolumina richteten sich nach der Art der Probe: Von PCRs wurden je 4 µL aufgetragen, von qPCRs je 10 µL, von analytischen Verdauen je 5 µL und von präparativen Verdauen jeweils der gesamte Ansatz von 20 µL. Vor dem Auftragen wurden die

DNA-Proben im Volumenverhältnis 5:1 mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Als Größenstandard wurde jeweils 4 µL DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen, die passend zur erwarteten Fragmentgröße in den Proben ausgewählt wurde.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde für ca. 1 h bei einer Maximalspannung von 150 V und einer maximalen Stromstärke von 100 mA durchgeführt. Anschließend wurde das Bandenmuster unter UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert oder benötigte DNA-Fragmente zur Aufreinigung (3.1.6) ausgeschnitten.

3.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

In einigen Fällen war die Aufreinigung von DNA-Fragmenten notwendig. PCR-Produkte (3.1.1), die zur TOPO-Klonierung (3.1.9) bestimmt waren, wurden vor Anfügen der 3'-Adenin-Überhänge (3.1.2) aufgereinigt. Präparative Restriktionsverdau (3.1.4.2), die zur Ligation (3.1.7) bestimmt waren, wurden ebenfalls aufgereinigt. Für Aufreinigungen von DNA-Fragmenten, die nicht mit anderen langen (>50 bp) DNA-Fragmenten gemischt waren, wurde das QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben verwendet. Nach präparativen Restriktionsverdauen von Plasmiden lag ein Gemisch verschieden langer DNA-Fragmente vor. Um daraus selektiv das gewünschte Fragment aufzureinigen, wurden solche Verdau zunächst einer Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5) unterzogen, die gewünschte DNA-Bande dann aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA daraus mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben aufgereinigt.

Beide Aufreinigungsmethoden sehen als letzten Schritt die Elution der DNA von einer Säule vor. Die Elution wurde jeweils mit 30 µL H₂O durchgeführt.

3.1.7 Ligation

Um Plasmide mit der gewünschten Sequenz zu klonieren, wurden zunächst durch PCR (3.1.1) und/oder präparativen Restriktionsverdau (3.1.4.2) die benötigten DNA-Fragmente mit komplementären Überhängen hergestellt. Diese wurden dann mit der T4-Ligase zu einem zirkulären Plasmid ligiert. Das Gesamtvolumen eines Ligationsansatzes betrug 10 µL. Tabelle 3.5 gibt die typische Zusammensetzung eines Ligationsansatzes wieder. Der Ligationsansatz wurde 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde er zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* verwendet (3.1.8).

Tabelle 3.5: Typische Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Bestandteil	Volumen
10x T4-Ligase-Puffer	1 μ L
Vektor-DNA	1 μ L
Insert-DNA	7 μ L
T4-Ligase	1 μ L

3.1.8 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Dieser Abschnitt behandelt die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* der Stämme DH5 α und BL21 pLys, die nach dem gleichen Protokoll behandelt wurden. Der Stamm DH5 α wurde verwendet, wenn das transformierte Plasmid vervielfältigt werden sollte, der Stamm BL21 pLys wurde verwendet, wenn das auf dem transformierten Plasmid codierte Protein bakteriell synthetisiert werden sollte. Die Transformation von *E. coli* One-Shot DH5 α im Rahmen der TOPO-Klonierung wurde nach einem separaten Protokoll durchgeführt und wird in einem separaten Abschnitt behandelt (3.1.9).

Zur Transformation mit DNA wurde ein Aliquot (200 μ L) chemisch kompetenter *E. coli* auf Eis aufgetaut. LB-Medium ohne Antibiotikum sowie eine LB-Agar-Platte mit dem benötigten Antibiotikum wurden auf 37 °C erwärmt. Den Bakterien wurden 1 μ L eines aus *E. coli* aufgereinigten Plasmids (3.1.10) oder 4 μ L Ligationsansatz (3.1.7) oder DpnI-verdautes (3.1.4.3) Produkt einer mutagenen PCR (3.1.3) zugesetzt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 90 s auf 42 °C erhitzt, anschließend wieder auf Eis gesetzt und dort 2 min belassen. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 37 °C inkubiert, bevor 800 μ L des erwärmten LB-Mediums zugesetzt wurden. Der Ansatz wurde unter Schütteln 1 h bei 37 °C inkubiert, um den transformierten Bakterien die Ausbildung der Antibiotika-Resistenz zu ermöglichen. Anschließend wurden die Bakterien auf der LB-Agar-Platte ausplattiert. Die Menge der ausplattierten Bakterien richtete sich nach der transfizierten DNA: Wurde ein aus *E. coli* aufgereinigtes Plasmid transformiert, wurden 50 μ L des Ansatzes ausplattiert. Stamme die transformierte DNA aus einem Ligationsansatz oder aus einem DpnI-Verdau, wurden die Bakterien zunächst in der Zentrifuge pelletiert (3 min/5700 g) und 800 μ L des Überstandes verworfen. Die Bakterien wurden dann in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert und ausplattiert. Die LB-Agar-Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass transformierte Bakterien Kolonien bilden konnten. Die Lagerung erfolgte mehrere Wochen bei 4 °C. Die Kolonien wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen genutzt, aus denen die Plasmid-DNA präpariert wurde (3.1.10), oder die zur bakteriellen Synthese von GST-RBD-Fusionsprotein verwendet wurden (3.2.10).

3.1.9 TOPO-Klonierung

TOPO-Klonierungen wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor und One-Shot DH5 α von Life Technologies (Invitrogen) durchgeführt.

Zunächst wurde eine TOPO-Ligation mit einem PCR-Produkt (3.1.1) mit 3'-Adenin-Überhängen (3.1.2) als Insert durchgeführt. Das Gesamtvolumen eines TOPO-Ligationsansatzes lag bei 6 μ L. Tabelle 3.6 gibt die Zusammensetzung eines TOPO-Ligationsansatzes wieder.

Tabelle 3.6: Zusammensetzung eines TOPO-Ligationsansatzes.

Bestandteil	Volumen
Insert-DNA	4 μ L
Salt Solution	1 μ L
TOPO-Vektor	1 μ L

Der TOPO-Ligationsansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das im Kit enthaltene SOC-Medium wurde bei Raumtemperatur aufgetaut, ein Aliquot One-Shot DH5 α wurde auf Eis aufgetaut. Eine LB-Agar-Platte mit 100 μ g/mL Ampicillin wurde auf 37 °C vorgewärmt. Dem Aliquot Bakterien wurde der TOPO-Ligationsansatz zugegeben. Der Ansatz wurde 25 min auf Eis inkubiert, anschließend für 30 s auf 42 °C erhitzt, dann noch einmal kurz auf Eis gesetzt. Dann wurden dem Ansatz 250 μ L SOC-Medium zugesetzt und er wurde unter Schütteln für 1 h bei 37 °C inkubiert. Auf der LB-Agar-Platte wurden erst 40 μ L X-gal-Lösung (40 mg/mL in DMF), dann die Bakterien ausplattiert. Die LB-Agar-Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass transformierte Bakterien Kolonien bilden konnten. Anschließend konnte die Platte mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden. Die Verwendung von X-gal erlaubt eine Unterscheidung von Kolonien mit leerem TOPO-Vektor und solchen, die TOPO-Vektor mit Insert tragen: Wenn der TOPO-Vektor ohne Insert ligiert, wird das im Vektor enthaltene *lacZ*-Gen unter der Kontrolle des Promotors exprimiert. Die so gebildete β -Galactosidase hydrolysiert das X-gal zu Galactose und einem Indol-Derivat, das zu einem blauen Farbstoff dimerisiert. Kolonien, die den leeren TOPO-Vektor tragen, sind daher blau gefärbt. Wurde bei der TOPO-Ligation das Insert in den Vektor ligiert, liegt dieses zwischen dem *lacZ*-Gen und seinem Promotor. Kolonien, die den TOPO-Vektor mit Insert tragen, bilden daher keine β -Galactosidase, können kein X-gal hydrolysieren und erscheinen auf der LB-Agar-Platte weiß. Nach TOPO-Klonierungen wurden daher nur weiße Kolonien zum Animpfen von Flüssigkulturen genutzt, aus denen die Plasmid-DNA präpariert wurde (3.1.10).

3.1.10 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde zunächst eine Übernachtskultur angesetzt. Hierzu wurden ca. 4 mL LB-Medium mit dem benötigten Antibiotikum mit einem *E. coli*-Einzelklon inokuliert und unter Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert. 4 mL der Übernachtskultur wurden pelletiert (3 min/5700 g). Die Präparation der Plasmid-DNA aus dem Pellet erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen oder mit dem GenElute Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich. Die Präparation erfolgte im Wesentlichen nach Herstellerangaben, es wurden jedoch folgende Modifikationen vorgenommen: Bei Verwendung des Kits von Sigma-Aldrich wurden die Säulen nicht equilibriert, bevor das geklärte Lysat aufgetragen wurde. Bei keinem der Kits wurde die auf der Säule gebundene Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen gewaschen. Die Elution erfolgte jeweils mit 50 µL H₂O. Die Konzentration der so erhaltenen Plasmid-DNA wurde spektrometrisch an einem Nanodrop ND-100 von PEQLAB bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde nach Bedarf durch analytischen Restriktionsverdau (3.1.4.1) und Sequenzierung auf ihre Sequenz hin überprüft und bei -20 °C gelagert. Sie wurde zur Transfektion in eukaryotische Zellen (3.3.3) oder zur weiteren Modifikation genutzt.

3.2 Biochemische Arbeiten

3.2.1 Gewinnung von Proteinlysaten aus eukaryotischen Zellen

Soweit nicht anders angegeben, wurden zur Gewinnung eines Proteinlysats je 4×10^4 Zellen in zwei Löcher einer 24-Loch-Platte ausgesät und 48 h später lysiert. Die Lyse wurde auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit eiskaltem RIPA-Lysepuffer versetzt. Für jeweils zwei Löcher einer 24-Loch-Platte, deren Inhalt zu einem Lysat vereinigt werden sollte, wurden zusammen 40 µL RIPA-Lysepuffer eingesetzt. Der Puffer wurde für einige Minuten auf den Zellen inkubiert und dann das Lysat durch Schaben gesammelt und in ein vorgekühltes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Unlösliche Bestandteile im Lysat wurden durch Zentrifugation pelletiert (15 min/15000 g/4 °C) und das so geklärte Lysat in ein frisches, vorgekühltes 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde nach der Bradford-Methode gemessen (3.2.2).

3.2.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Messung von Proteinkonzentrationen in Zelllysaten (3.2.1) wurde nach der Bradford-Methode vorgenommen (Bradford, 1976). Diese nutzt den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G 250. Durch die Bindung des Farbstoffs an Proteine verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm. Die OD bei 595 nm wird gemessen, und die absolute Proteinkonzentration kann daraus mit Hilfe einer Eichgeraden errechnet werden.

In dieser Arbeit wurde zur Konzentrationsbestimmung das Protein Assay Dye Reagent Concentrate von Bio-Rad verwendet. Zur Vorbereitung wurden von jedem Zelllysate 5 µL abgenommen und mit 10 µL H₂O verdünnt. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden aus einer BSA-Stammlösung (10 µg/µL) mehrere Verdünnungen angesetzt (2,0/1,4/1,0/0,6/0,2 µg/µL). Von jeder Lysat- und BSA-Verdünnung wurden zwei Absorptionmessungen durchgeführt. Dazu wurden in zwei Küvetten je 5 µL der Protein-Lösung vorgelegt und mit je 1 mL der nach Herstellerangaben verdünnten Bradford-Lösung aufgefüllt. Die Küvetten wurden einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann die OD₅₉₅ gemessen.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wandern Proteine in einem elektrischen Feld durch ein Polyacrylamid-Gel und werden dabei entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Methode wird unter denaturierenden Bedingungen in der Gegenwart von SDS durchgeführt. Dieses lagert sich an die Proteine an; der resultierende Komplex ist negativ geladen und wandert daher im elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode. Das Polyacrylamid-Gel schränkt die Beweglichkeit der Moleküle jedoch ein, so dass große Proteine langsamer wandern als kleine.

In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE genutzt (Laemmli, 1970), bei der das eigentliche Trenngel von einem Sammelgel überschichtet ist, welches einen geringeren Polyacrylamid-Gehalt und einen niedrigeren pH-Wert hat. Durch den Übertritt vom Sammel- in das Trenngel wird eine hohe Bandenschärfe erreicht. Die verwendeten Sammelgele hatten eine Polyacrylamid-Konzentration von 4%, die Trenngele, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins, eine Polyacrylamid-Konzentration von 10% (zur Untersuchung von p190A) oder 12% (zur Untersuchung von RhoA). Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist in Tabelle 3.7 angegeben.

Tabelle 3.7: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.

Bestandteil	Volumen		
	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)	Sammelgel (4%)
H ₂ O	1,9 mL	1,6 mL	2,89 mL
30% Acrylamid/Bisacrylamid	1,7 mL	2,0 mL	530 µL
1,5 M TRIS, pH 8,8	1,3 mL	1,3 mL	-
1,0 M TRIS, pH 6,8	-	-	500 µL
10% (w/v) SDS	50 µL	50 µL	40 µL
10% (w/v) APS	50 µL	50 µL	40 µL
TEMED	2 µL	2 µL	4 µL

Von den aufzutrennenden Proteinlysaten (3.2.1) wurde zuvor die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.2) und die aufzutragenden Volumina so gewählt, dass jede Probe die gleiche Gesamt-Proteinmenge enthielt: Sollten RhoA oder p190A mittels anschließendem Western Blot (3.2.5) und Immundetektion (3.2.5) analysiert werden, so wurden je 30 µg Gesamt-Protein aufgetragen. Vor dem Auftragen wurden die Proben im Volumenverhältnis 4:1 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Zur Größenabschätzung wurde zusätzlich ein Protein-Größenstandard aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde bei einer Stromstärke von 30-40 mA pro Gel durchgeführt.

3.2.4 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Membran (Renart *et al.*, 1979). Während das Gel die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erlaubt (3.2.3), können die Proteine, wenn sie auf einer Membran gebunden sind, durch Immundetektion nachgewiesen werden (3.2.5). In dieser Arbeit wurde Western Blot nach dem Semi-Dry-Verfahren im elektrischen Feld durchgeführt. Die Proteine wurden auf PVDF (Polyvinylidenfluorid) -Membran übertragen. Die Membran wurde zur Vorbereitung 10-15 s in Methanol geschwenkt, um sie zu aktivieren, dann 15 s in H₂O, um überschüssiges Methanol zu entfernen. Anschließend wurde die Membran 5 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Das Polyacrylamid-Gel wurde nach der SDS-PAGE 15 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Sechs Stücke Whatman-Papier wurden als Feuchtigkeits- und Ionen-Reservoir mit den verschiedenen Western Blot-Puffern getränkt wie unten angegeben. Die Komponenten wurden wie folgt auf der Plattenanode der Blotting-Kammer übereinandergeschichtet: 2x Whatman-Papier (Anodenpuffer I), 1x Whatman-Papier (Anodenpuffer II), Membran, Gel, 3x Whatman-Papier (Kathodenpuffer). Für den Blotting-

Vorgang selbst wurde die Blotting-Kammer von außen gekühlt und die aufgelegte Kathode zusätzlich beschwert, um guten elektrischen Kontakt sicherzustellen. Die für das Blotten angelegte Stromstärke betrug 5 mA/cm^2 , die Dauer des Blottens richtete sich nach der Größe des zu analysierenden Proteins. Sie reichte von 15 min zum Blotten von RhoA (ca. 22 kDa) bis zu 1 h zum Blotten von p190A (ca. 171 kDa). Nach dem Western Blot wurde durch Ponceau S-Färbung der Membran überprüft, dass die Proteine mit gleichmäßiger Effizienz auf die Membran übertragen wurden. Dazu wurde die Membran zunächst 5 min in Ponceau S-Gebrauchslösung geschwenkt, anschließend 5 min in H_2O , um den Hintergrund zu entfärben. Die gebundenen Proteine wurden dann mittels Immundetektion (3.2.5) nachgewiesen und quantifiziert.

3.2.5 Immundetektion

Bei der Immundetektion wird ein Protein auf einer Membran durch die spezifische Bindung eines Antikörpers nachgewiesen. Der Antikörper kann dabei unterschiedlich modifiziert sein, um seine Detektion nach verschiedenen Methoden zu ermöglichen. In dieser Arbeit wurde die indirekte Immundetektion angewandt. Bei dieser wird die Membran nacheinander mit zwei verschiedenen Antikörpern behandelt. Der Erst-Antikörper bindet am nachzuweisenden (Ziel-)Protein, ist aber nicht modifiziert und kann daher selbst nicht detektiert werden. Der Zweit-Antikörper bindet am Erst-Antikörper und trägt eine detektierbare Modifikation. Die in dieser Arbeit verwendeten Zweit-Antikörper waren mit HRP (Meerrettichperoxidase, *horseradish peroxidase*) gekoppelt, einem Enzym, das unter anderem Luminol oxidiert. Die vom Reaktionsprodukt emittierte Chemolumineszenz wurde detektiert und zur Quantifikation des Zielproteins genutzt.

Zur Immundetektion von Proteinen, die auf einer PVDF-Membran gebunden waren, wurde die Membran zunächst in Blockier-Lösung inkubiert (1 h/RT). Dann folgte die Inkubation mit dem in Blockier-Lösung verdünnten Erst-Antikörper (ÜN/4 °C). Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen und dann mit dem in Blockier-Lösung verdünnten Zweit-Antikörper inkubiert (1 h/RT). Dann wurde die Membran erneut dreimal für je 10 min gewaschen, wobei die ersten beiden Waschschrte in TBS-T, der letzte in TBS durchgeführt wurden. Als Substrat für die Luminol-Reaktion wurde das SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate von Thermo Scientific (Pierce) nach Herstellerangaben verwendet. Die Chemolumineszenz wurde digital dokumentiert und mit ImageJ quantifiziert. In einer elektrophoretisch aufgetrennten Proteinprobe wurden mehrere Proteine parallel nachgewiesen, indem die Membran vor der Inkubation in Blockier-Lösung so geschnitten

wurde, dass alle nachzuweisenden Proteine anschließend auf getrennten Membranstücken lagen. Wo dies nötig war, wurde schon für die SDS-PAGE (3.2.3) ein vorgefärbter Protein-Größenstandard verwendet, dessen farbige Banden beim Schneiden der Membran als Referenz dienten. Die Membranstücke wurden im Folgenden getrennt voneinander prozessiert. Bei der späteren Analyse konnte dann die Menge des Zielproteins in einer Probe auf die Menge eines Referenzproteins in derselben Probe normalisiert werden. So konnte die Immundetektion genutzt werden, um die Depletion eines Proteins in siRNA-behandelten Zellen zu quantifizieren (3.3.4) oder um nach einem RhoA-Pulldown die absolute und relative Menge aktiven RhoAs zu messen (3.2.9).

3.2.6 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Soweit nicht anders angegeben, wurden zur Gewinnung eines RNA-Lysats je 4×10^4 Zellen in zwei Löcher einer 24-Loch-Platte ausgesät und 48 h später lysiert. Die Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von QIAGEN und wurde im Wesentlichen nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Homogenisierung des RNA-Lysats wurden die QIAshredder-Säulen von QIAGEN nach Herstellerangaben verwendet. Der im RNeasy Mini Kit empfohlene DNase-Verdau wurde mit dem RNase-Free DNase Set von QIAGEN ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution der aufgereinigten RNA erfolgte jeweils mit 30 μL H_2O , die Lagerung bei -80°C . Die Konzentration der so erhaltenen RNA wurde spektrometrisch an einem Nanodrop ND-100 von PEQLAB bestimmt.

3.2.7 cDNA-Synthese

Aufgereinigte RNA (3.2.6) wurde als Templat für cDNA-Synthesen verwendet. Bei der cDNA-Synthese synthetisiert eine reverse Transkriptase an einem RNA-Templat einen komplementären DNA-Strang. Bis auf den Unterschied in Templat und Polymerase ähnelt die cDNA-Synthese stark der PCR (3.1.1). Da in dieser Arbeit die cDNAs der mRNAs benötigt wurden, wurden als Primer für die cDNA-Synthese Desoxythymidin-Oligomere (Oligo-dTs) eingesetzt, die an den Poly-Adenin-Schwanz von mRNA binden und so die Synthese von cDNAs ermöglichen, die zur gesamten codierenden Sequenz der mRNAs komplementär sind.

Das Gesamtvolumen eines cDNA-Synthese-Ansatzes betrug 20 μL . Tabelle 3.8 gibt die typische Zusammensetzung und Temperaturführung einer cDNA-Synthese wieder.

Tabelle 3.8: Typische Zusammensetzung und Temperaturführung einer cDNA-Synthese.

Bestandteil	Volumen bzw. Masse
RNA	250-500 ng
dNTP-Mix	1 µL
Oligo-dTs	1 µL
H ₂ O	ad 12 µL
Inkubation: 5 min/ 65 °C, dann kurz auf Eis	
5x First Strand Buffer	4 µL
0,1 M DTT	2 µL
RNaseOUT™	1 µL
Inkubation: 2 min/42 °C	
SuperScript™ II	1 µL
Inkubation: 50 min/42 °C	
Inkubation: 15 min/70 °C	

Die cDNA wurde als Templat für quantitative Echtzeit-PCR (3.2.8) verwendet.

3.2.8 quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) ist eine PCR (3.1.1), bei der schon während der Durchführung quantitative Daten über die Amplifikation der Zielsequenz erhoben werden. Dazu wird die Reaktion in einem Thermozykler-Fluoreszenzmessungs-Kombinationsgerät durchgeführt. Die qPCRs in dieser Arbeit wurden mit dem StepOnePlus-Gerät von Life Technologies (Applied Biosystems) durchgeführt, welches 96-Loch-qPCR-Platten aufnimmt und so die simultane qPCR von maximal 96 verschiedenen Ansätzen erlaubt. Die Amplifikation wurde mit Hilfe des Farbstoffs SYBR Green verfolgt. Dieser Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und bildet mit dieser einen fluoreszierenden Komplex. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Menge doppelsträngiger DNA im PCR-Ansatz und wird jeweils zwischen zwei Amplifikationszyklen gemessen. Aus den erhobenen Daten lässt sich die Effizienz der Amplifikation, aber auch die Menge des ursprünglich vorhandenen Templats berechnen.

In dieser Arbeit wurde die qPCR genutzt, um die Depletion der Ziel-mRNAs nach siRNA-Behandlung zu quantifizieren. Dazu wurde aus siRNA-behandelten Zellen (3.3.4) RNA isoliert (3.2.6), diese als Templat zur cDNA-Synthese verwendet (3.2.7) und die cDNA als Templat in der qPCR eingesetzt. Obwohl in der qPCR also die Menge einer bestimmten

cDNA gemessen wird, dient die Methode zur indirekten Quantifizierung der zugehörigen mRNA in der ursprünglich isolierten RNA-Probe. Als Referenzwert für die mRNA-Menge wurden parallel dazu Zellen derselben Analyse unterzogen, die mit ntsiRNA behandelt wurden, welche keinen Einfluss auf die Ziel-mRNA hat. Außerdem wurde in jeder RNA-Probe nicht nur die Menge der Ziel-mRNA, sondern auch der mRNA dreier Referenzgene gemessen, welche durch keine der siRNAs beeinflusst werden. Die Quantifizierung der Referenz-mRNAs diente zur Eliminierung störender Einflüsse, gegenüber denen die qPCR aufgrund ihrer hohen Sensitivität sehr empfindlich ist. So können sich die cDNA-Mengen in den qPCR-Ansätzen verschiedener RNA-Proben nicht nur aufgrund realer Differenzen in den Mengen der entsprechenden mRNAs unterscheiden, sondern auch aufgrund von Mess- oder Pipettierungenauigkeiten bei jedem Schritt, aufgrund der unterschiedlichen Integrität der isolierten RNA-Proben oder aufgrund unterschiedlicher Effizienzen zweier cDNA-Synthese-Ansätze. Für jede RNA-Probe wurde daher die Menge der Ziel-mRNA zunächst auf die Menge jeder Referenz-mRNA normalisiert, bevor die Ziel-mRNA-Mengen zweier RNA-Proben miteinander verglichen wurden. Außerdem wurde für jede RNA-Probe ein qPCR-Ansatz pipettiert, der keine Primer enthielt, sowie für jedes der verwendeten Primerpaare ein qPCR-Ansatz, der keine cDNA enthielt. Diese Ansätze wurden als Negativkontrollen verwendet, in denen bei ausreichender Reinheit aller Komponenten keine Amplifikation stattfinden konnte. Um die Genauigkeit weiter zu erhöhen, wurde jeder qPCR-Ansatz im Triplikat angesetzt. Für jedes verwendete Primerpaar wurde ein Primer-Polymerase-Mix, für jede verwendete cDNA ein cDNA-Mix angesetzt. Tabelle 3.9a gibt die Zusammensetzung dieser Mixe pro qPCR-Ansatz wieder. Von jedem Mix wurde ein Volumen angesetzt, welches ausreichte, um alle benötigten Löcher der qPCR-Platte zu bestücken. In jedem Loch der qPCR-Platte wurden dann 12 μL des benötigten Primer-Polymerase-Mixes vorgelegt und 8 μL des benötigten cDNA-Mixes zugegeben. Tabelle 3.9b gibt die Temperaturführung während der qPCR wieder.

Tabelle 3.9a: Zusammensetzung eines qPCR-Ansatzes.

Mix	Bestandteil	Volumen bzw. Masse
cDNA-Mix	cDNA	entspr. 10 ng RNA
	H ₂ O	ad 8 μL
Primer-Polymerase-Mix	Fast SYBR Green Master Mix	10 μL
	Primerpaar (je 5 μM oder QuantiTect Primer Assay)	2 μL

Tabelle 3.9b: Temperaturverlauf einer qPCR.

Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
95	20 s	1
95	3 s	40
60	30 s	
95	15 s	
60	1 min	
schrittweise Erhöhung um 0,3	-	bis 95 °C

Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte mit der Software des StepOnePlus™-Thermozyklers. Es wurden zunächst die C_T -Werte aller PCR-Ansätze gemessen. Der C_T -Wert bezeichnet den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Ansatzes einen definierten Schwellenwert erreicht. Dieser Schwellenwert wurde für alle cDNAs auf 0,03 festgelegt. Der Schwellenwert wird umso früher erreicht, je mehr Templat-cDNA mit der zu amplifizierenden Sequenz zu Beginn der qPCR vorliegt. Der C_T -Wert eines qPCR-Ansatzes ist daher ein Maß für die Menge einer spezifischen mRNA in der RNA-Probe. Um absolute Unterschiede in den C_T -Werten zweier RNA-Proben in relative Mengenunterschiede der spezifischen mRNAs umzurechnen, muss jedoch auch die maximale Effizienz der Amplifikation berücksichtigt werden (Freeman *et al.*, 1999). Diese wurde nach Rutledge und Stewart anhand der Entwicklung der Fluoreszenz während der qPCR bestimmt (Rutledge und Stewart, 2008). Dazu wurde zunächst für jedes Primerpaar die Effizienz für jeden einzelnen Zyklus berechnet, indem die Fluoreszenz-Intensität nach dem Zyklus durch die Fluoreszenz-Intensität vor dem Zyklus geteilt wurde. Die so erhaltenen Effizienzen aus allen qPCR-Ansätzen mit diesem Primerpaar wurden gegen die Fluoreszenz aufgetragen. An den linearen Teil der Auftragung wurde eine Ausgleichsgerade angepasst. Dazu wurde zunächst jeweils der Zyklus bestimmt, in dem der absolute Zuwachs an Amplifikat am größten war. An die Daten aus diesem Zyklus sowie aus den zwei vorhergehenden und zwei folgenden Zyklen wurde die Ausgleichsgerade angepasst. Der Schnittpunkt dieser Ausgleichsgeraden mit der Y-Achse gab die maximale Effizienz des Primerpaars an. Abbildung 3.1 zeigt eine exemplarische Auftragung zur Feststellung der maximalen Effizienz.

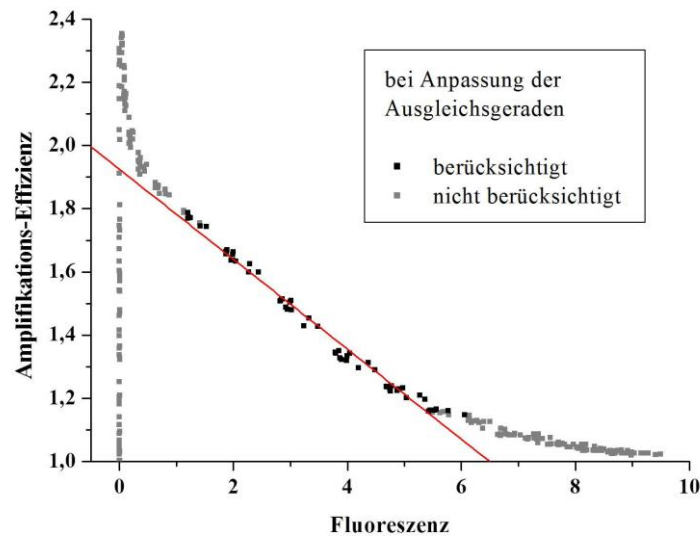


Abbildung 3.1: Exemplarische Auftragung zur Feststellung einer maximalen Amplifikations-Effizienz eines qPCR-Primerpaares.

Nach Formel 3.1 wurde die Menge an Ziel-mRNA berechnet, die aus siRNA-behandelten Zellen isoliert wurde. Der erhaltene Wert ist auf die Menge an Ziel-mRNA in einer ntsiRNA-behandelten Probe normalisiert. Zusätzlich sind beide Ziel-mRNA-Mengen auf Referenz-mRNA-Mengen derselben RNA-Probe normalisiert, um den Einfluss der oben genannten Fehlerquellen auf das Ergebnis zu eliminieren.

Formel 3.1:

$$mRNA_{Ziel,si} = \frac{E_{Referenz} (C_{T,Referenz,si} - C_{T,Referenz,nt})}{E_{Ziel} (C_{T,Ziel,si} - C_{T,Ziel,nt})}$$

E: maximale Effizienz der Amplifikation

C_T: Zyklus, bei dem der Fluoreszenz-Schwellenwert erreicht wird

Subskripte:

Ziel: bei Amplifikation der Ziel-cDNA

Referenz: bei Amplifikation der Referenz-cDNA

si: in der siRNA-behandelten Probe

nt: in der ntsiRNA-behandelten Probe

Die Ziel-mRNA-Menge wurde separat auf jede der untersuchten Referenz-mRNA-Mengen normalisiert und aus den erhaltenen Werten der Mittelwert gebildet.

3.2.9 RhoA-Aktivitäts-Pulldown

Der RhoA-Aktivitäts-Pulldown ist eine biochemische Methode, mit der die Reaktion von Zellen auf Stimuli, welche die Aktivierung oder Inaktivierung von RhoA bewirken, untersucht werden kann (Pellegrin und Mellor, 2008). Dazu werden die Zellen unter nativen Bedingungen lysiert und das Lysat mit Sepharose-Partikeln inkubiert. Diese sind mit einem GST-RBD-Fusionsprotein (GST, Glutathion-S-Transferase) beschichtet, dessen RBD-Teil aktives, nicht aber inaktives RhoA bindet. Die Sepharose wird anschließend durch Zentrifugation vom Lysat getrennt, das gebundene RhoA durch Denaturierung von den Partikeln gelöst und durch SDS-PAGE (3.2.3), Western Blot (3.2.4) und Immundetektion (3.2.5) quantifiziert. Durch zusätzliche Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehalts im Lysat lässt sich feststellen, welcher Anteil des gesamten RhoAs zum Zeitpunkt der Lyse in der aktiven Form vorlag.

In dieser Arbeit wurden RhoA-Pulldowns zu zwei verschiedenen Zwecken durchgeführt: Zum einen wurde damit der Einfluss von HGF auf die RhoA-Aktivität in A549-Zellen untersucht. Zum anderen wurde mit dieser Methode überprüft, ob die Mutation Q63L in RhoA, die zu einer konstitutiven Aktivierung der GTPase führt (Khosravi-Far *et al.*, 1994), diesen Effekt auch in dem RhoA-Biosensor zeigt, der in dieser Arbeit verwendet wurde. Im Folgenden wird zunächst der RhoA-Pulldown beschrieben, wie er an HGF-stimulierten A549-Zellen durchgeführt wurde. Dazu wurden jeweils 7×10^5 Zellen in 10 cm-Kulturschalen ausgesät. 32 h später wurde das Kulturmedium gegen Serummangel-Medium ausgetauscht, weitere 16 h später erfolgte die Behandlung mit HGF (20 ng/mL in Serummangel-Medium). Sollte der HGF-Einfluss zu unterschiedlichen Zeiten charakterisiert werden, erfolgten die Behandlungen zeitlich versetzt, so dass die Lyse aller Zellen zum gleichen Zeitpunkt stattfinden konnte. Um die Zellen zu lysieren, wurde das Medium aus den Kulturschalen abgesaugt und die Schalen auf Eis zweimal mit je 6 mL eiskaltem Pulldown-TBS gewaschen. Dann wurden 550 μ L eiskalter Pulldown-Lysepuffer in jede Schale gegeben und durch Schwenken die gesamte Wachstumsfläche benetzt. Die Schalen wurden einige Minuten auf Eis inkubiert und die Lysate durch Schaben gesammelt und in vorgekühlte 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation pelletiert (15 min/17530 g/4 °C). Für jedes Lysat wurden drei frische 1,5 mL-Reaktionsgefäße folgendermaßen vorbereitet: In einem Gefäß wurden 12 μ L 4x SDS-Probenpuffer vorgelegt, in einem Gefäß wurden 10 μ L H₂O vorgelegt, das dritte Gefäß blieb leer. Alle Gefäße wurden auf Eis vorgekühlt. Aus den geklärten Lysaten wurden jeweils folgende Volumina überführt: 36 μ L zur Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehaltes in den vorgelegten 4x SDS-Probenpuffer, 5 μ L zur Bestimmung der

Proteinkonzentration in das vorgelegte H₂O und 500 µL für den Pulldown in das leere Reaktionsgefäß. Die Lysat-Reste wurden vereinigt und im Volumenverhältnis 3:1 mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt. In jedes 500 µL-Aliquot Lysats wurde dasselbe Volumen einer beständig durchmischten Suspension GST-RBD-beschichteter Sepharose-Partikel gegeben. Die Beschichtung der Sepharose erfolgte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit (3.2.10). Das Volumen der Sepharose-Suspension wurde so gewählt, dass jedem Lysat 30 µg des GST-RBD-Fusionsproteins zugesetzt wurden. Die Pulldown-Proben mit der Sepharose wurden unter langsamer Rotation inkubiert (45 min/4 °C), so dass das aktive RhoA aus den Lysaten an die RBD auf den Sepharose-Partikeln binden konnte. Die Lysat-Proben zur Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehaltes sowie die vereinigten Lysat-Reste wurden für 5 min auf 95 °C erhitzt und bis zur weiteren Prozessierung auf Eis gelagert. Die Sepharose in den Pulldown-Proben wurde durch Zentrifugation pelletiert (1 min/500 g/4 °C) und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde viermal durch Resuspension in je 600 µL Pulldown-Waschpuffer, erneute Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde mit GELoader Tips der Firma Eppendorf alle verbliebene Flüssigkeit von der Sepharose entfernt. Jedes Sepharose-Pellet wurde dann in je 40 µL vorgewärmtem 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Suspensionen wurden für 10 min auf 95 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Sowohl die Pulldown-Proben als auch die Proben zu Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehaltes wurden dann durch SDS-PAGE (3.2.3) in 12%igen Gelen aufgetrennt. Dabei wurden alle Pulldown-Proben auf einem Gel aufgetragen, alle Gesamt-RhoA-Proben auf einem anderen. Außerdem wurden auf jedem Gel die äußersten Spuren mit je 40 µL der für die Analyse irrelevanten Lysat-Reste beladen, damit keine der zur Analyse benötigten Proben sich über eine größere Breite verteilen konnte als die anderen. Die Proteine wurden per 15-minütigem Western Blot (3.2.4) mit anschließender Immundetektion (3.2.5) quantifiziert. Die relative Menge aktiven RhoAs in einer Probe wurde berechnet, indem die Intensität der RhoA-Bande aus der Pulldown-Probe durch die Intensität der RhoA-Bande aus der zugehörigen Probe zur Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehaltes geteilt wurde. Sollten die relativen RhoA-Aktivitäten in mehreren Lysaten verglichen werden, so war zuvor die Intensität der RhoA-Bande aus der Probe zur Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehaltes durch die Intensität der α-Tubulin-Bande derselben Probe geteilt worden. Die Proteinkonzentration der mit H₂O verdünnten Lysat-Proben wurde nach der Bradford-Methode gemessen (3.2.2), um sicherzustellen, dass die Vitalität der Zellen in allen Schalen vergleichbar war.

Der RhoA-Pulldown an Zellen, die den Biosensor exprimierten, wurde nahezu identisch durchgeführt. Unterschiede gab es lediglich in der Anzucht der Zellen, der Menge an Lysat, sowie der Dauer des Western Blots: Für diesen Pulldown wurden je $7,5 \times 10^4$ MDCK-Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten ausgesät. Für jedes spätere Lysat wurden dabei die Zellen aus zwei Löchern vorgesehen, die identisch prozessiert wurden. Die Zellen wurden nach 32 h mit Plasmid-DNA transfiziert (3.3.3), 16 h später wurde das Medium gegen Serummangel-Medium ausgetauscht, und nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert. Es wurden 225 μ L Pulldown-Lysepuffer pro Loch verwendet, so dass nach Vereinigung der Lysate aus je zwei Löchern jede Probe ein Volumen von 450 μ L hatte. Für die Inkubation mit den GST-RBD-beschichteten Sepharose-Partikeln wurden daher nur 350 μ L Lysat eingesetzt. Alle anderen Versuchsbedingungen blieben unverändert. Lediglich die Dauer des Western Blots wurde auf 25 min erhöht, da die hier zu transferierenden Biosensor-Moleküle mit ca. 78-89 kDa wesentlich schwerer waren als RhoA alleine.

3.2.10 Beschichtung von Glutathion-Sepharose mit GST-RBD-Fusionsprotein

Für die RhoA-Pulldowns (3.2.9) in dieser Arbeit wurden Glutathion-Sepharose-Partikel mit einem GST-RBD-Fusionsprotein beschichtet (Pellegrin und Mellor, 2008). Dazu wurde das GST-RBD-Plasmid, das die bakterielle Synthese von GST-RBD unter der Kontrolle des *lac*-Promotors erlaubt, in chemisch kompetente *E. coli* BL21 rosetta pLys transformiert (3.1.8). Die Identität des Plasmids wurde durch Präparation aus transformierten Einzelklonen (3.1.10), analytischen Restriktionsverdau (3.1.4.1) und anschließende Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5) überprüft. Aus einem Einzelklon wurden dann 4 mL vorgewärmtes LB-Medium mit Antibiotika-Zusätzen inokuliert und über Nacht unter Schütteln inkubiert (16 h/37 °C). Mit dieser Übernachtskultur wurden dann 400 mL vorgewärmtes LB-Medium mit Antibiotika-Zusätzen inokuliert und diese weiter unter Schütteln inkubiert (24 h/37 °C). Vier 2 L-Erlenmeyerkolben mit je 900 mL LB-Medium wurden auf 37 °C vorgewärmt, mit Antibiotika versetzt und mit je 100 mL der Übernachtskultur inokuliert. Die Kulturen wurden weiter unter Schütteln inkubiert (37 °C), bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Dann wurde die Synthese des Fusionsproteins durch Zugabe von 1 mL 1 M IPTG zu jeder Kultur induziert (Endkonzentration: 1 mM) und weitere 2 h unter Schwenken inkubiert. Dann wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert (25 min/2500 g/4 °C), der Überstand verworfen und die Pellets bei 4 °C in insgesamt 40 mL eiskaltem Sepharose-Lysepuffer vollständig resuspendiert. Die Suspension wurde auf zwei vorgekühlte 50 mL-Reaktionsgefäße verteilt und die Bakterien mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde unter ständiger Eiskühlung

an einem Ultraschall-Homogenisator im Pulsmodus (80% der Maximalleistung) der Inhalt jedes Reaktionsgefäßes in Zyklen von 30 s aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde für beide Gefäße alternierend durchgeführt, so dass der Inhalt jedes Reaktionsgefäßes zwischen zwei Zyklen jeweils mindestens 30 sec auf Eis abkühlte. Für jedes Reaktionsgefäß wurden 20 Zyklen dieser Behandlung durchgeführt. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation pelletiert (30 min/17000 g/4 °C). Es wurde so viel Sepharose-Suspension in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß gegeben, dass die enthaltenen Sepharose-Partikel nach Ablagerung ein Volumen von 600 µL einnahmen. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation sedimentiert (1 min/500 g/4 °C) und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde viermal durch Resuspension in je 800 µL eiskaltem Sepharose-Lysepuffer, erneute Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes äquilibriert. Die geklärten Bakterien-Lysate wurden in einem frischen, vorgekühlten 50 mL-Reaktionsgefäß vereinigt. Die äquilibrierte Sepharose wurde in einem geringen Volumen des Lysats aufgenommen und in das Lysat gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde mehrmals mit Lysat gespült, um die gesamte Sepharose zu überführen. Das Lysat-Sepharose-Gemisch wurde rotierend inkubiert, um die Bindung des GST-RBD-Fusionsproteins an die Sepharose zu erlauben (1 h/4 °C). Dann wurde die Sepharose durch Zentrifugation sedimentiert (1 min/500 g/4 °C) und der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde in einem Gesamtvolumen von 12 mL eiskaltem Sepharose-Waschpuffer aufgenommen und in ein vorgekühltes 15 mL-Reaktionsgefäß überführt, wobei das Volumen auf zweimal 6 mL aufgeteilt wurde, mit denen das 50 mL-Reaktionsgefäß zweimal gespült wurde, um die gesamte Sepharose zu überführen. Die Suspension wurde zentrifugiert (1 min/500 g/4 °C), der Überstand verworfen. Die Sepharose wurde sechsmal durch Resuspension, erneute Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes gewaschen. Die ersten fünf Waschschrte erfolgten in je 12 mL eiskaltem Sepharose-Waschpuffer, der letzte in 12 mL eiskaltem Sepharose-Lagerpuffer. Nach dem letzten Waschschrte wurde die Sepharose in 8 mL eiskaltem Sepharose-Lagerpuffer aufgenommen. Der beständig durchmischten Suspension wurden 45 µL zur späteren Quantifizierung des gebundenen Fusionsproteins entnommen; der Rest wurde zu je 200 µL in vorgekühlte 1,5 mL-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Die 45 µL Sepharose-Suspension, die zur Quantifizierung des gebundenen Fusionsproteins entnommen worden waren, wurden mit 15 µL 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Aus einer BSA-Stammlösung (10 µg/µL) wurden in einer Verdünnungsreihe in Sepharose-Lagerpuffer je 10 µL BSA-Lösung mit Konzentrationen von 10, 5, 2,5 und 1 µg angesetzt. Diese wurden mit je 3,33 µL 4x SDS-Probenpuffer versetzt und

für 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Sepharose- und BSA-Proben wurden auf ein 12%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen, wobei die Sepharose-Probe in separate Volumina von 20, 13,33 und 6,67 µL aufgeteilt wurde. Die Proben wurden per SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.3) und das Gel anschließend zunächst für 1 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt, um die Proteinbanden zu färben, anschließend über Nacht in Coomassie-Entfärbelösung, um den Hintergrund zu entfärben. Die Banden wurden digital dokumentiert und die anschließend mit ImageJ quantifiziert. Jede GST-RBD-Bande wurde an jener BSA-Bande quantifiziert, deren Intensität ihr am ähnlichsten war. So wurde für jede GST-RBD-Bande ein Wert des GST-RBD-Gehaltes in 100 µL Sepharose-Suspension erhalten. Das Volumen an Sepharose-Suspension, welches 30 µg GST-RBD-Fusionsprotein enthielt und für einen RhoA-Pulldown dem Zelllysatz zugesetzt werden musste, wurde anhand der niedrigsten errechneten GST-RBD-Konzentration bestimmt. So wurde sichergestellt, dass trotz der Ungenauigkeit der Quantifizierung genug GST-RBD in jeder Pulldown-Reaktion (3.2.9) zum Einsatz kam.

3.3 Zellbiologische Arbeiten

3.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

In dieser Arbeit wurden die adhärenenten, eukaryotischen Zelllinien A549 und MDCK verwendet. Beide Zelllinien unterschieden sich nur leicht in ihren Kultivierungsbedingungen und werden daher hier gemeinsam beschrieben: Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 10 cm-Kulturschalen in Kulturmedium, bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Flüssigkeiten, die auf die Zellen gegeben wurden, zuvor auf 37 °C erwärmt. Bei Erreichen von >80% Konfluenz wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und Reste durch zweimaliges Waschen mit je 6 mL PBS entfernt. Die Zellen wurden mit Trypsin von den Schalen abgelöst. Dazu wurden MDCK-Zellen mit 2 mL Trypsin versetzt, welches in der Schale verteilt, sofort abgesaugt und durch 2 mL frisches Trypsin ersetzt wurde. A549-Zellen wurden lediglich einmal mit 2 mL Trypsin versetzt. Die Zellen wurden bis zur Ablösung bei 37 °C inkubiert (A549: ca. 4 min; MDCK: ca. 6 min), dann in 8 mL frischem Kulturmedium aufgenommen und durch Pipettieren vereinzelt. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. In frischen Kulturschalen wurden je 10 cm Kulturmedium vorgelegt, definierte Volumina der Zellsuspension zugegeben und die Zellen durch Pipettieren gleichmäßig verteilt. Die Volumina wurden in Abhängigkeit der Zelldichte und der geplanten Dauer bis zur nächsten Subkultivierung gewählt. Tabelle 3.10 gibt für beide Zelllinien die umgesetzten Zellzahlen an.

Tabelle 3.10: Bei der Subkultivierung umgesetzte Zellzahlen.

Zelllinie	Zellzahl	Kultivierungsdauer [d]
A549	3×10^5	4
A549	4×10^5	3
MDCK	3×10^5	3
MDCK	7×10^5	2

3.3.2 HGF-Behandlung

3.3.2.1 HGF-Behandlung von A549-Zellen

Zur HGF-Behandlung wurden A549-Zellen in unterschiedlichen Kulturgefäßen ausgesät. Sollte nach der HGF-Behandlung ein RhoA-Aktivitäts-Pulldown vorgenommen werden, wurden je 7×10^5 Zellen in Kulturmedium in 10 cm-Kulturschalen ausgesät. Sollte die Reaktion auf HGF in lebenden Zellen per Phasenkontrast-Mikroskopie untersucht werden (3.4.1), wurden je 1×10^5 Zellen in Kulturmedium in 3,5 cm-Schalen mit ibidi-Standard-Boden (ibidi) ausgesät. In beiden Fällen wurde nach 32 h das Kulturmedium gegen Serummangel-Medium ausgetauscht; dabei wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen. Mindestens 16 h später erfolgte die Behandlung mit HGF (Endkonzentration 20 ng/mL in Serummangel-Medium oder Mikroskopie-Medium).

3.3.2.2 HGF-Behandlung von MDCK-Zellen

Je nach Anwendung wurden MDCK-Zellen zur HGF-Behandlung in unterschiedlichen Kulturgefäßen ausgesät. Für FLIM- und TIRF-Mikroskopie (3.4.4 und 3.4.5) wurden je 1×10^4 Zellen in Kulturmedium in 3,5 cm-Glasbodenschalen (MatTek) ausgesät. Für konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (3.4.2) wurden je $0,4 \times 10^4$ Zellen in Kulturmedium auf runde Deckgläschen in den Löchern einer 24-Loch-Platte ausgesät. Die Deckgläschen wurden zur Vorbereitung für mindestens 20 min in 70% Ethanol sterilisiert und dann einzeln in die Löcher einer 24-Loch-Platte gegeben. Dort wurden die Deckgläschen vor dem Aussäen der Zellen zweimal mit je 500 µL PBS gewaschen, um verbliebenen Ethanol zu entfernen. Nach 32 h wurden die Zellen mit Plasmid-DNA transfiziert (3.3.3). 16 h später wurde das Transfektionsmedium gegen Serummangel-Medium ausgetauscht; dabei wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen. Mindestens 24 h später erfolgte die Behandlung mit HGF (Endkonzentration 10 ng/mL in Mikroskopie-Medium).

3.3.3 Transfektion von MDCK-Zellen mit Plasmid-DNA

Als Transfektionsreagenz für MDCK-Zellen wurde Effectene von QIAGEN verwendet. Die Transfektion wurde 32 h nach dem Aussäen der Zellen (3.3.2.2) im Wesentlichen nach Herstellerangaben durchgeführt, lediglich die Menge an transfizierter DNA sowie das Mengenverhältnis DNA:Effectene wurden optimiert. Es wurden für ein Loch einer 24-Loch-Platte 400 ng Plasmid-DNA eingesetzt, für eine 3,5 cm-Glasbodenschale oder ein Loch einer 6-Loch-Platte 800 ng Plasmid-DNA. Das Mengenverhältnis DNA:Effectene war in allen Transfektionen konstant: Pro 1 µg zu transfizierender DNA wurden 12,5 µL Effectene eingesetzt. Tabelle 3.11 gibt die Zusammensetzung von Transfektionsansätzen für die verwendeten Kulturgefäß-Größen an.

Tabelle 3.11: Zusammensetzung von Plasmid-DNA-Transfektionsansätzen.

Bestandteil	Volumen bzw. Masse pro	
	Loch in 24-Loch-Platte	Loch in 6-Loch-Platte bzw. 3,5 cm-Glasbodenschale
EC-Puffer	60 µL	100 µL
DNA	400 ng	800 ng
Enhancer	3,2 µL	6,4 µL
Effectene	5 µL	10 µL
Transfektionsmedium	300 µL	700 µL
	365 µL ausgebracht	810 µL ausgebracht

Trotz der Herstellerangabe, dass Effectene auch Transfektionen in Gegenwart von Antibiotika erlaubt, wurden Transfektionen in Abwesenheit von Antibiotika durchgeführt. Daher wurde nicht nur das Aufnehmen des Transfektionsansatzes, das der Hersteller vorsieht, in antibiotikafreiem Transfektionsmedium vorgenommen, sondern auch das normale Kulturmedium auf den Zellen vor Zugabe des Transfektionsansatzes abgesaugt, verbliebenes Kulturmedium durch einmaliges Waschen mit PBS entfernt und je 400 µL bzw. 1,6 mL (24- bzw. 6-Loch-Platte/3,5 cm-Glasbodenschale) antibiotikafreies Transfektionsmedium auf die Zellen gegeben.

3.3.4 Transfektion von A549-Zellen mit siRNA

Für die siRNA-Transfektion wurden je $3,8 \times 10^5$ A549-Zellen in 1,9 mL Transfektionsmedium in die Löcher einer 6-Loch-Platte ausgesät. Die Transfektion selbst erfolgte 6 h später. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine 2000 von Life Technologies (Invitrogen) verwendet. Die Konzentration der verwendeten siRNA-Stammlösungen betrug 10 μ M. Sollte eine Transfektion mit einer Mischung mehrerer siRNAs durchgeführt werden, wurden gleiche Mengen der siRNAs zunächst zu einer Stammlösung mit einer Gesamtkonzentration von 10 μ M vereint. Transfektionsreagenz und siRNA wurden separat in Opti-MEM (Life Technologies (Gibco)) verdünnt und die Verdünnungen 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionsreagenz-Verdünnung wurde dann zweimal mit der Pipette aufgezogen und in die siRNA-Verdünnung gegeben. Der Ansatz wurde weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die (Gesamt-)Endkonzentration der siRNA auf den Zellen betrug 5 nM. Tabelle 3.12 gibt die Zusammensetzung von Transfektionsansätzen an.

Tabelle 3.12: Zusammensetzung von siRNA-Transfektionsansätzen.

Bestandteil	Volumen
Lipofectamine 2000	3 μ L in 50 μ L Opti-MEM
siRNA	1 μ L in 50 μ L Opti-MEM

16 h nach der Transfektion wurden die Zellen in neue Kulturgefäße überführt. Dazu wurde jedes Loch einer 6-Loch-Platte zweimal mit je 2 mL PBS gewaschen und dann bis zur Ablösung der Zellen mit 100 μ L Trypsin bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen in je 900 μ L Kulturmedium aufgenommen, durch Pipettieren vereinzelt und die Zelldichte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden für HGF-Behandlung ausgesät (3.3.2.1), sowie zur Gewinnung von Proteinlysaten (3.2.1) und/oder Isolation von RNA (3.2.6). Aus jeder Zellsuspension wurden sowohl für Proteinlysate, als auch für RNA-Isolation je 2 Löcher einer 24-Loch-Platte bestückt, deren Inhalte später vereinigt wurden. Anhand der Lysate wurde die Knockdown-Effizienz mittels SPS-PAGE (3.2.3), Western Blot (3.2.4) und Immundetektion (3.2.5) auf Proteinebene und/oder mittels cDNA-Synthese (3.2.7) und qPCR (3.2.8) auf mRNA-Ebene quantifiziert. Die Zeitverläufe der verschiedenen Anwendungen waren dabei so aufeinander abgestimmt, dass sowohl die phänotypischen Untersuchungen der Zellen, als auch die Lyse zum Nachweis der Knockdown-Effizienz 72 h nach der siRNA-Transfektion stattfanden.

3.4 Mikroskopie

3.4.1 Phasenkontrast-Mikroskopie lebender, HGF-stimulierter A549-Zellen

Lebende A549-Zellen wurden mittels Phasenkontrast-Mikroskopie an einem invertierten Mikroskop (Eclipse Ti-E, Nikon), mit einem 20x Luft-Objektiv (S Plan Fluor ELWD 20x DIC N1, Nikon; NA: 0,45), einer 100 W-Lampe (TI-PS, Nikon) und einer 14-bit-Kamera (CoolSNAP HQ2, Roper Scientific) untersucht. Das Mikroskop war mit einer Inkubatorkammer ausgestattet, die für die Untersuchungen auf 37 °C geheizt wurde.

Die Probenanzucht wurde wie in Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben vorgenommen. Unmittelbar vor Einsetzen in das Mikroskop wurde das Serummangel-Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen einmal mit je 2 mL PBS gewaschen und dann mit je 2 mL Mikroskopie-Medium überschichtet.

Die Aufnahmedauer pro Probe war variabel. Die Zellen wurden in Intervallen von 1 min fotografiert. Falls die Aufnahmedauer über 2 h betrug, wurde nach 2 h das Intervall auf 5 min erhöht. Der Fokus wurde über die gesamte Aufnahmedauer mit Hilfe des PFS (*perfect focus system*, selbsterhaltendes Fokussystem) konstant gehalten. Das Verhalten der Zellen wurde in mehreren Gesichtsfeldern parallel beobachtet. Es wurden je zwei 3,5 cm-Kulturschalen mit ibidi-Standard-Boden gleichzeitig in den Probentisch eingesetzt und in jeder bis zu zehn Positionen parallel beobachtet. Die Positionen wurden dabei mit der Multipunkt-Funktion der Mikroskop-Software automatisiert ausgewählt. Die Proben wurden zunächst für 30 min ohne HGF mikroskopiert, dann die Aufnahme unterbrochen und je 1 mL des Mikroskopie-Mediums ausgetauscht gegen Mikroskopie-Medium mit HGF (Endkonzentration 20 ng/mL). Der Mediumaustausch erfolgte in einigen Experimenten direkt auf dem Probentisch, in anderen Experimenten wurden die Proben dazu dem Probentisch entnommen; dies ist für die einzelnen Experimente separat angegeben.

Die Bilder wurden mit höchstmöglicher Auflösung bei voller dynamischer Breite der Kamera (kalibrierter Amplituden-Status 2 bzw. „1x“) mit einer Auslese-Geschwindigkeit von 20 MHz und einer Belichtungszeit von 10 ms aufgenommen.

3.4.2 konfokale Laser-Raster-Fluoreszenz-Mikroskopie lebender, RhoA-Biosensor-exprimierender Zellen

Die verschiedenen RhoA-Biosensor-Varianten wurden in lebenden MDCK-Zellen an einem invertierten konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (TCS SP5, Leica) mit einem 63x Öl-Objektiv (HCX PL APO lambda blue 63,0xOIL UV, Leica; NA: 1,40) untersucht. Das

verwendete System nutzte als Detektoren Photoelektronenvervielfacher (PMTs, *photomultiplier tubes*), deren Detektionsfenster mit einem akusto-optischen Strahlteiler (AOBS, *acousto-optical beam splitter*) stufenlos reguliert werden konnten. Als Lichtquellen dienten nach Bedarf ein Helium-Neon-Laser (594 nm) sowie ein Argonlaser (514 nm und 458 nm). Der Argon-Laser wurde, soweit nicht anders angegeben, bei 30% seiner Maximalleistung betrieben. Die Intensität der einzelnen verwendeten Laserlinien wurde nach Bedarf reguliert. Das Mikroskop war mit einer Inkubatorkammer ausgestattet, die für die Untersuchungen auf 37 °C geheizt wurde.

Die Probenanzucht wurde wie in Abschnitten 3.3.2.2 und 3.3.3 beschrieben vorgenommen. Die zu mikroskopierenden Zellen waren demnach auf runden Deckgläschen adhäriert, die in den Löchern von 24-Loch-Platten lagen. Am Morgen des Mikroskopie-Tages wurde das Serummangel-Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen einmal mit je 500 µL PBS gewaschen und dann mit je 500 µL Mikroskopie-Medium überschichtet. Als Mikroskop-Halterung für je ein rundes Deckgläschen wurde ein Aluminium-Plättchen verwendet. Dieses hatte eine Stärke von ca. 1,5 mm und wies ein rundes Loch auf, dessen Durchmesser ca. 2 mm kleiner als der der Deckgläschen war. Um das Loch herum wurde beidseitig eine dünne Schicht Schliff fett aufgetragen. Das Loch wurde dann auf der einen Seite durch eines der Proben-Deckgläschen verschlossen, so dass die unbewachsene Seite außen lag. Die Zellen wurden mit 150 µL Mikroskopie-Medium mit 1% (v/v) OxyFluor und 10 ng/mL HGF überschichtet und die andere Seite des Loches dann mit einem trockenen, unbewachsenen Deckgläschen verschlossen. Mit der Bildaufnahme wurde erst jeweils 20 min nach Einsetzen einer so vorbereiteten Probe in den Probentisch begonnen. Nach dieser Zeit war der Fokus stabil und die Reaktion der Zellen auf das HGF deutlich sichtbar.

Die Aufnahmen wurden mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Objektiv:	63x Öl (NA: 1,40)
Bit-Tiefe:	16-bit
Lochblenden-Weite:	2 AU
Zoom-Faktor:	2,5
<i>Line Average</i> :	4 (d.h. vierfaches Scannen jeder Bildzeile, daraus Mittelwertbildung für jeden Pixel; Einstellung zur Verbesserung des Signal-zu-Rauschen-Verhältnisses)
Auflösung:	512x512 Pixel
Scan-Geschwindigkeit:	100 Hz

Scan-Modus:	bidirektional
Donor-/FRET-Anregung:	458 nm
Akzeptor-Anregung:	514 nm
Intensität der Anregung:	5:1 (Donor:Akzeptor)
Donor-Detektion:	PMT 1, 463-505 nm
Akzeptor-/FRET-Detektion:	PMT 3, 525-550 nm
PMT-Verstärkerspannung:	800 V
PMT-Achsversetzung:	0%
Notch-Filter:	458/514

Soweit nicht anders angegeben, wurden für jede Zelle drei Anregungen durchgeführt, bei denen fünf Bilder in der folgenden Reihenfolge aufgezeichnet wurden:

1. Anregung: simultane Aufzeichnung je eines Donor- und FRET-Bildes
2. Anregung: Aufzeichnung eines Akzeptor-Bildes
3. Anregung: simultane Aufzeichnung je eines Donor- und FRET-Bildes

Die Aufzeichnung erfolgte sequentiell in der *between lines*-Einstellung. Bei dieser Einstellung wird zuerst die erste Bildzeile des ersten Donor-/FRET-Bildpaares angeregt und aufgezeichnet, danach die erste Bildzeile des Akzeptor-Bildes, schließlich die erste Bildzeile des zweiten Donor-/FRET-Bildpaares. Auch alle weiteren Bildzeilen werden nach dem gleichen Prinzip aufgezeichnet. Durch diese Einstellung wurde der zeitliche Versatz zwischen den einzelnen Bildern nahezu eliminiert, ohne jedoch Donor- und Akzeptor-Anregung gleichzeitig einstrahlen zu müssen.

Soweit nicht anders angegeben, wurden aus jeder Probe 20 Zellen fotografiert. Außerdem wurde von jeder Probe ein Gesichtsfeld ohne Anregung aufgezeichnet, das zur Bestimmung der tagesaktuellen Rausch-Kenngrößen B und σ_d diente (3.4.3).

3.4.3 konfokale Laser-Raster-Mikroskopie an Fluorophor-Lösungen

Drei charakteristische Kenngrößen, die das Rauschen eines analog-zu-digital-Umsetzers beschreiben, sind der Verstärkungsfaktor des Umsetzers (A), die Höhe des Hintergrundsignals (B) sowie die Standardabweichung des Hintergrundsignals (σ_d). Für die Einstellungen, mit denen in dieser Arbeit die FRET-Paare CFP-YFP und cerulean-YFP an dem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop TCS SP5 (Leica) untersucht wurden, sowie für modifizierte Einstellungen, die ein schlechteres Signal-zu-Rauschen-Verhältnis (SNR, *signal-to-noise ratio*) erwarten lassen, wurden diese Kenngrößen bestimmt. Die Varianz eines gemessenen

Signals steigt linear mit dessen Helligkeit an, und der Proportionalitätsfaktor zwischen beiden Größen entspricht dem Verstärkungsfaktor A des analog-zu-digital-Umsetzers (Wang, 2007). Daher wurden zur Bestimmung der Kenngröße A Bilder mit jeweils homogener Signalverteilung, jedoch untereinander unterschiedlicher Helligkeit aufgezeichnet. Dazu wurden zunächst rekombinant synthetisiertes CFP und YFP in H₂O gelöst (Stammlösungen 1 mg/mL). Die Stammlösungen wurden separat in PBS auf 2 μ M (CFP) bzw. 1 μ M (YFP) verdünnt und die Fluoreszenz mit dem TCS SP5-System aufgezeichnet. Es wurde dieselbe Halterung verwendet wie für die RhoA-Biosensor-Untersuchungen an diesem System (3.4.2).

Die Aufnahmen wurden mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Objektiv:	63x Öl (NA: 1,40)
Bit-Tiefe:	16-bit
Lochblenden-Weite:	2 AU
Zoom-Faktor:	2,5
<i>Line Average</i> :	1/2/3/4
Auflösung:	512x512 Pixel
Scan-Geschwindigkeit:	100 Hz für <i>Line Averages</i> 2-4 100/200/400 Hz für <i>Line Average</i> 1
Scan-Modus:	bidirektional
CFP-Detektion:	PMT 1, 463-505 nm
YFP-/FRET-Detektion:	PMT 3, 525-550 nm
PMT-Verstärkerspannung:	800 V
PMT-Achsversetzung:	0%
Notch-Filter:	458/514

Für jedes Gesichtsfeld wurden zwei Anregungen in der *between lines*-Einstellung durchgeführt. Bei jeder der Anregungen wurde mit beiden PMTs in den angegebenen Grenzen detektiert, obwohl CFP-Lösungen nur mit 458 nm, YFP-Lösungen nur mit 514 nm angeregt wurden. Mit welcher Wellenlänge die Anregung erfolgt, ist für die Messung der Rausch-Kenngrößen unerheblich. Für jede der Fluorophor-Lösungen wurden pro Experiment an drei verschiedenen Positionen Bilder mit einer Anregungs-Intensität von 100, 80, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 und 0% aufgezeichnet. Für jede Position wurde diese Anregungs-Reihe für jede oben angegebene Kombination von *Line Average* und Scan-Geschwindigkeit durchgeführt. Für alle Kombinationen wurde eine separate Auswertung durchgeführt, da ein

individuelles Signal-zu-Rauschen-Verhältnis und somit ein individueller Satz von Rausch-Kenngrößen erwartet wurde.

Zur Bestimmung der Rausch-Kenngrößen von PMT 1 wurden ausschließlich Bilder verwendet, die an CFP-Lösungen aufgezeichnet wurden, zur Bestimmung der Rausch-Kenngrößen von PMT 3 nur solche, die an YFP-Lösungen aufgezeichnet wurden. Die Bilder aus einem Laser-Raster-Mikroskop weisen an den Rändern senkrechte Streifen auf, die von der Umkehrbewegung des Lasers herrühren. Monodirektional aufgezeichnete Bilder haben einen solchen Streifen nur an einem Bildrand, bidirektional aufgezeichnete an zwei gegenüberliegenden. Die Varianzen der verschiedenen Helligkeiten wurden daher nicht an den vollständigen Bildern gemessen, sondern jeweils an einem Bildausschnitt, der keine solchen technisch bedingten Unregelmäßigkeiten aufwies. Dieser Bildausschnitt hatte für alle Bilder eines Gesichtsfeldes dieselbe Größe und Position. Außerdem wurden nur solche Bildausschnitte ausgewertet, bei denen die dynamische Breite des PMTs nicht voll ausgeschöpft war (d.h. nur Bilder, die „nicht überbelichtet“ waren), was andernfalls die messbare Varianz des Signals verringert hätte. Die Varianzen der Bildausschnitte wurden gegen ihre Helligkeit aufgetragen, eine Ausgleichsgerade an die Daten angepasst und deren Steigung als A definiert. Die Rausch-Kenngrößen B und σ_d für jeden PMT wurden definiert als Helligkeit und Standardabweichung von Bildausschnitten, die ohne jegliche Anregung aufgezeichnet wurden.

3.4.4 Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Membran-Lokalisation der verschiedenen RhoA-Biosensor-Varianten sowie von mCherry-RBD wurde in lebenden MDCK-Zellen mittels Interner Totalreflexions-Fluoreszenz (TIRF, *total internal reflection fluorescence*) -Mikroskopie an einem invertierten Mikroskop (Eclipse Ti-E, Nikon), mit einem 100x TIRF-Objektiv (Apo TIRF 100xOIL, Nikon; NA 1,49), DPSS-Lasern (488 und 561 nm) sowie einer Intensilight-Epifluoreszenz-Lampe und einer 14-bit-Kamera (DR-328G-C01-SIL Clara (Andor)) untersucht. Das Mikroskop war mit einer Inkubatorkammer ausgestattet, die für die Untersuchungen auf 37 °C geheizt wurde.

Die Probenanzucht wurde wie in Abschnitten 3.3.2.2 und 3.3.3 beschrieben vorgenommen. Unmittelbar vor dem Mikroskopieren wurde das Serummangel-Medium von den Zellen abgesaugt und durch je 2 mL Mikroskopie-Medium mit 1% (v/v) OxyFluor und 10 ng/mL HGF ersetzt. Bis die Proben in den Probentisch eingesetzt und fokussiert waren, war die Reaktion der Zellen auf das HGF bereits deutlich sichtbar. Pro Zelle wurden je ein TIRF-Bild und ein Epifluoreszenz-Bild mit voller Auflösung und 800 ms Belichtungszeit aufgezeichnet.

3.4.5 Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie des RhoA-Biosensors

Die Fluoreszenz-Lebensdauer von CFP wurde in verschiedenen Varianten des RhoA-Biosensors mittels FLIM (Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie, *fluorescence lifetime microscopy*) an einem invertierten konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (Fluoview FV1000, Olympus) mit einem 60x-Objektiv (UPlasSApo, Olympus; NA: 1,35) untersucht. Zur Anregung wurde ein gepulster Dioden-Laser (440 nm, Pulsdauer 70 ps, PicoQuant) genutzt. Die Detektion erfolgte mittels einer Einzelphotonen-Lawinendiode (SPAD, *single photon avalanche diode*, Micro Photon Devices) und einem Modul zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (PicoHarp 300, PicoQuant). Das Mikroskop war mit einer Inkubatorkammer ausgestattet, die für die Untersuchungen auf 37 °C geheizt wurde.

Die Probenanzucht wurde wie in Abschnitten 3.3.2.2 und 3.3.3 beschrieben vorgenommen. Vor dem Mikroskopieren wurde das Serummangel-Medium von den Zellen abgesaugt, die Zellen einmal mit 2 mL PBS gewaschen und mit 1,5 mL Mikroskopie-Medium mit 1% (v/v) OxyFluor überschichtet. Jeder Probe wurden kurz vor dem Einsetzen in den Probenstisch 0,5-1 mL Mikroskopie-Medium mit 1% (v/v) OxyFluor und HGF (Endkonzentration 10 ng/mL) zugesetzt. Von jeder Zelle wurden Konfokal-Aufnahmen gemacht, die CFP- und YFP-Fluoreszenz sowie das Durchlicht-Bild zeigten; dann wurde die FLIM-Messung durchgeführt. Zum Bleichen von YFP wurde ca. 4 min mit 100% Leistung der 515 nm-Laserlinie belichtet.

Die Aufnahmen wurden mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Objektiv:	60x Öl (NA: 1,35)
Lochblenden-Weite:	200 µm
Zoom-Faktor:	variabel, meist 2,5-3
Auflösung:	512x512
Scan-Geschwindigkeit:	schnell (2 µs/Pixel)
Scan-Modus:	monodirektional
Konfokal-Aufnahmen:	
Bit-Tiefe:	12-bit
CFP-Detektion:	800 V, 468-505 nm
YFP-Detektion:	550 V, 525-625 nm
Transmissions-Detektion:	365 V
Achsversetzung:	0 %
Filter-Methode:	Kalman, je 2 Bilder, Kanalwechsel zwischen Bildern

FLIM-Aufnahmen:

Die Emissions-Feinblende des gepulsten Lasers wurde vor dem Bleichen von YFP für jede Zelle so einreguliert, dass die Einzelphotonen-Lawinen-Diode ca. 1×10^5 Photonen/s zählte. Die Messung wurde gestoppt, wenn für den hellsten Pixel ein Wert von 200 Photonen erreicht war.

3.5 Auswertung von Bilddaten**3.5.1 ImageJ**

Die frei erhältliche Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) wurde für die meisten Bildanalysen genutzt (Auswertung von Immundetektionsbanden (3.2.5) und Coomassie-gefärbten Proteinbanden (3.2.10), Phasenkontrast-Mikroskopie (3.4.1), Laser-Raster-Fluoreszenz-Mikroskopie (3.4.2 und 3.4.3). Für komplexere oder häufig durchzuführende Analysen wurden Makros programmiert, um die Bildverarbeitung zu automatisieren.

3.5.1.1 Analyse von Phasenkontrast-Zeitraffer-Mikroskopie-Aufnahmen

Phasenkontrast-Zeitraffer-Filme wurden mit einer 14-bit-Kamera aufgezeichnet (3.4.1), vor der Analyse jedoch nach 8-bit konvertiert. Zur automatisierten Bewegungs- und Zelldichte-Analyse wurden im Rahmen dieser Arbeit Makros entworfen und programmiert. Die Ergebnisse aus Bewegungs- und Zelldichte-Analyse wurden über alle Gesichtsfelder einer Zellpopulation aufsummiert.

3.5.1.1.1 Bewegungs-Analyse

Zur Bewegungs-Analyse von Phasenkontrast-Zeitraffer-Filmen wurden zunächst xy- sowie Helligkeits-Unregelmäßigkeiten automatisiert eliminiert. Xy-Unregelmäßigkeiten wurden z.B. durch leichte Bewegungen der Probe auf dem Probentisch oder durch Ungenauigkeiten beim Anfahren der einzelnen zu beobachtenden Positionen verursacht. Sie wurden durch Phasenkorrelation berechnet und durch entsprechende Translation der Bilder eines Films eliminiert. Dabei wurde die Annahme gemacht, dass die tatsächlichen Bewegungen der Zellen, die der Film zeigte, keinen Einfluss auf das Ergebnis der Phasenkorrelation hatten, da in den Versuchen keine bevorzugte Migrationsrichtung zu erwarten war und sich daher die Bewegungen aller Zellen im Gesichtsfeld statistisch gegenseitig ausglich. Nach Eliminierung der xy-Unregelmäßigkeiten wurde das Gesichtsfeld automatisiert so verkleinert,

dass Bildteile, die nicht über den gesamten Film sichtbar waren, abgeschnitten wurden. Dann wurden Helligkeits-Schwankungen eliminiert, indem durch Multiplikation und Division alle Bilder eines Films auf den Helligkeits-Mittelwert des ersten Bildes dieses Films gebracht wurden. Ähnlich wie die Phasenkorrelation geschah dies unter der Annahme, dass sich Helligkeitsveränderungen einzelner Zellen, die sich durch veränderten Kontrast infolge ihrer Bewegung ergaben, statistisch gegenseitig ausglich und somit keinen Einfluss auf den Helligkeits-Mittelwerte eines ganzen Bildes hatten. An den so korrigierten Filmen konnte nun die Bewegung zwischen aufeinanderfolgenden Bildern quantifiziert werden. Dazu wurde jedes Bild des Films in einer Pixel-durch-Pixel-Division durch das vorhergehende Bild geteilt. Das resultierende Quotientenbild hatte einen Mittelwert von 1, wies jedoch an den Stellen, an denen Bewegung stattgefunden hatte, erhöhte bzw. erniedrigte Werte auf. Um zu definieren, welche Erhöhung bzw. Erniedrigung als Bewegung gewertet werden sollte, wurde ein Schwellenfaktor festgelegt. Lag der Schwellenfaktor bei x , so wurden alle Pixel des Quotientenbildes, welche heller waren als $x/1$, als Pixel gewertet, in welchen zwischen den beiden Bildern Bewegung stattgefunden hatte. Ebenso wurden Pixel gewertet, die dunkler waren als $1/x$. Die Gesamtzahl der Pixel, in denen zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildern unter Berücksichtigung des Schwellenfaktor Bewegung stattgefunden hatte, wurde automatisiert gemessen. Als Schwellenfaktor für die Analysen wurde 1,33 festgesetzt (Optimierung s. Abschnitt 4.1.1.3). Fehler in dieser automatisierten Bewegungsanalyse traten besonders dann auf, wenn lose Partikel durch das Gesichtsfeld trieben, die als große, „bewegte“ Flächen gewertet wurden. Der Einfluss solcher Partikel wurde manuell minimiert: Zeigte ein Quotientenbild das Bewegungs-Artefakt eines losen Partikels, so wurde der Messwert für dieses Quotientenbild durch den Mittelwert der Messwerte aus den davor und dahinter liegenden Quotientenbildern ersetzt. Phasenkontrast-Filme, in denen so viele lose Partikel auftraten, dass eine solche Korrektur nicht möglich war, wurden in der Analyse nicht berücksichtigt.

3.5.1.1.2 Zelldichte-Analyse

Die Gesichtsfelder verschiedener Zeitraffer-Filme zeigten oft unterschiedliche Zelldichten. Um dennoch verschiedene Zeitraffer-Filme hinsichtlich der Stärke der Zellbewegung vergleichen zu können, sollte die bewegte Fläche in Prozent der gesamten bewachsenen Fläche angegeben werden. Dazu wurde die Zelldichte ebenfalls automatisiert gemessen. Das geschah nach der Bewegungs-Analyse, so dass auch hier nur das verkleinerte Gesichtsfeld nach Eliminierung der xy-Unregelmäßigkeiten analysiert wurde. Dabei wurde die Tatsache

genutzt, dass unbewachsene Flächen in den Zeitraffer-Filmen eine gleichmäßige Helligkeit aufwiesen, während die Helligkeit bewachsener Flächen stark variierte. Für jeden Bildpixel wurden daher automatisch die Helligkeit sowie deren Standardabweichung seiner Umgebung in einem bestimmten Radius r gemessen. Der Radius r wurde auf drei Pixel festgesetzt (Optimierung s. Abschnitt 4.1.1.1). Überschritt die gemessene Standardabweichung einen bestimmten Prozentsatz σ_s der Helligkeit, so wurde der Bildpixel als bewachsene Fläche gewertet. Der Schwellenwert σ_s wurde auf 5,5% festgesetzt (Optimierung s. Abschnitt 4.1.1.1). Als bewachsene Fläche gewertete Bildpixel wurden im Bild kenntlich gemacht, indem ihre Helligkeit auf 0 gesetzt wurde. Bildpixel, deren Helligkeit von vornherein 0 war, wurden daher auch immer als bewachsene Fläche gewertet. Zusätzlich wurden Bildpixel mit der Helligkeit 255 grundsätzlich als bewachsen gewertet. Da beide Helligkeiten in unbewachsenen Flächen ohnehin nicht auftraten, entstand durch diese Klassifizierung kein Fehler. Eine Fehlerquelle für diese Methode waren jedoch große, flache Membranausstülpungen der Zellen, die einen so geringen Kontrast aufwiesen, dass sie fälschlicherweise als unbewachsen gewertet wurden. Um diesen Fehler zu minimieren, wurden zusammenhängende, als unbewachsen gewertete Flächen, deren Größe unter einem bestimmten Schwellenwert P lag, ebenfalls als bewachsen gewertet. Für diesen Schritt wurde die „Analyze Particle“-Funktion von ImageJ genutzt. Der Schwellenwert P für die Klassifizierung einer kleinen, kontrastschwachen Fläche als „bewachsen“ wurde auf 250 Pixel festgesetzt (Optimierung s. Abschnitt 4.1.1.1). Als Ergebnis der Analyse wurden vier Bilder ausgegeben (vgl. Abbildung 4.1 B, c)-f)). Eines davon war eine helligkeitscodierte Darstellung des Quotienten von Standardabweichung und Helligkeit für jeden Pixel (σ_s -Bild). In den anderen drei Bildern waren die Flächen kenntlich gemacht, die als bewachsen klassifiziert worden waren. Eines dieser drei Bilder zeigte nur die Flächen, die dem σ_s -Kriterium genügten (netto-Bild), ein anderes zeigte in binärer Darstellung nur jene Flächen, die nach dem Mindestgrößen-Kriterium als bewachsen klassifiziert worden waren (Mindestgrößen-Bild). Das letzte Bild (brutto-Bild) zeigte alle als bewachsen klassifizierten Flächen und somit das Ergebnis der Analyse. Der Vergleich mit dem ursprünglichen Bild erlaubte so eine optische Kontrolle der Zelldichte-Analyse. Die anderen Ergebnis-Bilder dienten als Anhaltspunkte zur Optimierung der Variablen.

Die Zelldichte-Analyse wurde jeweils nur am ersten Bild eines Zeitraffer-Films durchgeführt, aber als Referenz für die Bewegungs-Analyse des gesamten Films genutzt. Es wurde daher die Annahme gemacht, dass die Zelldichte über die Dauer des Films im Wesentlichen konstant war. Trat jedoch während eines Zeitraffer-Films ein großer Sprung des

Gesichtsfeldes auf (z.B. durch HGF-Stimulation der Probe abseits des Probenfisches), wurden, beginnend bei der Phasenkorrelation, alle Analysen für die Bilder nach dem Sprung separat durchgeführt.

3.5.1.2 Analyse von RhoA-Biosensor-Bildern vom Laser-Raster-Fluoreszenz-Mikroskop

Die Analyse der Daten, die mit den RhoA-Biosensor-Konstrukten am Laser-Raster-Fluoreszenz-Mikroskop gesammelt wurden (3.4.2), wurde in der Software ImageJ so weit möglich automatisiert. Das SNR der Bilder wurde, soweit nicht anders angegeben, mit dem PureDenoise-Makro mit manueller Rausch-Abschätzung verbessert (Luisier *et al.*, 2011). Bei manueller Rausch-Abschätzung werden die notwendigen Rausch-Kenngrößen A, B und σ_d manuell vorgegeben. Als Wert für A wurde dabei der Mittelwert der Werte verwendet, die durch Messung an Fluorophor-Lösungen für den betreffenden PMT errechnet worden waren (3.4.3). Die Werte für B und σ_d für jeden PMT wurden für jedes Experiment an separat aufgenommenen Bildern ohne Anregung bestimmt. Alle Schritte der eigentlichen Analyse wurden, soweit sie im Folgenden nicht explizit als manuell bezeichnet werden, automatisiert durchgeführt: Zunächst wurde manuell vorgegeben, welches Bild einer Zelle welchen Kanal (Donor, FRET oder Akzeptor) zeigte. Das SNR der Bilder wurde dann mit dem PureDenoise-Makro verbessert. Anschließend wurde am Akzeptor-Bild manuell eine Hintergrund-Region definiert, deren mittlere Helligkeit in jedem Bild von dem gesamten Bild subtrahiert wurde (Hintergrund-Korrektur). Am Akzeptor-Bild wurde dann ebenfalls manuell ein Helligkeitsschwellenwert gesetzt, der so gewählt wurde, dass ein möglichst großer Teil des Bildhintergrundes unterhalb des Schwellenwertes lag, die gesamte Zellfläche jedoch oberhalb des Schwellenwertes. Anhand dieses Schwellenwertes wurde dann ein binäres Bild erstellt, das für alle Pixel oberhalb des Schwellenwertes, also auch für die Zellfläche, den Wert 1 hatte, für Pixel unterhalb des Schwellenwertes, also idealerweise für den gesamten Hintergrund, den Wert 0 (Maske). Mit dieser Maske wurden alle Bilder dieser Zelle multipliziert, so dass für die weitere Analyse nur noch in der tatsächlichen Zellfläche Signal erhalten blieb (Maskieren). Durch das Maskieren war es häufig nicht möglich, alle Pixel zu eliminieren, die nicht zur untersuchten Zelle gehörten (z.B. wenn im gleichen Gesichtsfeld noch eine weitere Zelle den RhoA-Biosensor exprimierte). Daher wurde am maskierten Akzeptor-Bild noch einmal manuell die Zelle so umrandet, dass verbliebene Pixel, die nicht zu dieser Zelle gehörten, ausgeschlossen wurden. Anhand dieser Auswahl wurde eine weitere Maske erstellt, indem zunächst alle Pixel außerhalb der Umrandung eliminiert wurden und dann ein binäres Bild erstellt wurde, das wiederum nur in allen verbliebenen Pixeln den Wert

1, in allen anderen Pixeln den Wert 0 hatte (geklärte Maske). Die geklärte Maske wurde zu einem späteren Zeitpunkt in der Analyse benötigt. In einigen Experimenten wurde kein Akzeptor-Bild aufgezeichnet. Die drei genannten manuellen Schritte der Analyse (Definition einer Hintergrund-Region, Festsetzung des Schwellenwertes zur Erstellung der Maske sowie Definition der Zell-Region zur Erstellung der geklärten Maske) konnten dann nicht an einem Akzeptor-Bild durchgeführt werden. In solchen Fällen wurde für diese Schritte ein FRET-Bild der Zelle genutzt. Die verschiedenen Hintergrund-korrigierten und maskierten Bilder einer Zelle wurden mittels Pixel-durch-Pixel-Division miteinander verglichen: Jeweils ein Bild wurde durch das andere geteilt, wobei beide Bilder zuvor nach 32-bit konvertiert wurden. Das Zählerbild wurde dann noch vor dem Divisionsschritt mit dem Faktor 1000 multipliziert. Durch diese Multiplikation entstanden häufig Werte, die im ursprünglichen 16-bit-Format nicht mehr darstellbar gewesen wären. Das Quotientenbild, das als Resultat der Division entstand, wurde nach 16-bit zurückkonvertiert. Hellere Stellen im Quotientenbild zeigten an, wo die Helligkeit des Zählerbildes im Vergleich zum Nennerbild überdurchschnittlich hoch war, dunklere Stellen im Quotientenbild zeigten an, wo die Helligkeit des Zählerbildes im Vergleich zum Nennerbild besonders niedrig war. Quotientenbilder wurden nach den Bildern benannt, aus denen sie berechnet wurden. So bezeichnet z.B. „FRET/CFP“ ein Quotientenbild, das durch Division eines FRET-Bildes durch ein CFP-Bild entstanden ist. Die Histogramm-Breite jedes Quotientenbildes wurde ebenfalls gemessen und daraus eine individuell skalierte 8-bit-Darstellung des Bildes erstellt. Erfahrungsgemäß erhält man einen guten Eindruck von der Helligkeitsverteilung in einem Biosensor-Quotientenbild, wenn man die Skalierungsgrenzen so setzt, dass 2% der Zellfläche dunkler als die untere Skalierungsgrenze und weitere 2% der Zellfläche heller als die obere Skalierungsgrenze sind. Um diese Werte zu erhalten, wurde das Quotientenbild mit der geklärten Maske multipliziert, so dass nur noch Pixel erhalten blieben, die zu der untersuchten Zelle gehörten. Für die Helligkeiten aller verbliebenen Pixel wurden das 2. bzw. 98. Perzentil bestimmt. Diese beiden Werte wurden für die 8-bit-Darstellung als individuelle untere bzw. obere Skalierungsgrenze verwendet, der Faktor zwischen beiden wurde als Skalierungsfaktor des Quotientenbildes definiert. Quotientenbilder erscheinen in dieser Arbeit in einer Fehlfarbandarstellung, in der dunkle Flächen in kalten Farben wiedergegeben werden, helle Flächen in warmen Farben. Bilder von Einzelkanälen erscheinen, soweit nicht anders angegeben, nach erfolgter Hintergrund-Korrektur und erster Maskierung, und als Unter- bzw. Obergrenze ihrer Helligkeits-Darstellung werden die Helligkeiten ihres jeweils dunkelsten bzw. hellsten Pixels gesetzt.

Die Multiplikation eines Bildes mit der geklärten Maske derselben Zelle wurde ebenfalls angewandt, um die mittlere Helligkeit einer Zelle zu messen. So wurde verhindert, dass die Größe der Zelle oder die Helligkeit anderer im Bild liegender Zellen die Messung beeinflussten.

3.5.2 IgorPro

Die Analyse von FLIM-Daten wurde mit dem pFLIM-Makro (Walther *et al.*, 2011) in der Software IgorPro (Version 5.3.2.2, WaveMetrics) vorgenommen. Die Daten wurden entsprechend der Gebrauchsanleitung des Makros analysiert. Dabei wurde an die Abklingkurve der Fluoreszenz von CFP-RhoA-Daten eine zweitermige Exponentialfunktion angepasst, an die der RhoA-Biosensor-Konstrukte eine dreitermige Exponentialfunktion. Für die Einzelpixel-Berechnung der Fluoreszenz-Lebensdauer wurde für alle Konstrukte jeweils eine zweitermige Exponentialfunktion angepasst, da das Makro diese Analyse unter Annahme eines dreitermigen exponentiellen Fluoreszenz-Abfalls nicht vorsieht.

4 Ergebnisse

4.1 Die Bedeutung von RhoA-Signalwegen in der HGF-Reaktion von A549-Zellen

Vorversuche an der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 (Giard *et al.*, 1973) zeigten eine deutliche Reaktion der Zellen auf 20 ng/mL HGF (nicht gezeigt): Unmittelbar nach Zugabe des HGF bildeten die Zellen dynamische Membranausstülpungen, die in schneller Folge nach vorn gestreckt und dann nach oben zurückgefaltet wurden. Bei diesem Rückfaltungsprozess schnürten sich häufig endosomal aussehende Strukturen ins Zellinnere ab. Diese starke Reaktion dauerte ca. 20 min an, bevor sich das Verhalten der Zellen erneut veränderte: Die Membranausstülpungen waren dann zumeist auf einen schmalen Bereich beschränkt. In einem mehrstündigen Prozess nahmen die Zellen ein spindelförmiges Erscheinungsbild an.

4.1.1 Optimierung der Makros für die Bildauswertung

Um an den in dieser Arbeit aufgezeichneten Phasenkontrast-Zeitraffer-Filmen Bewegungsanalysen durchführen zu können, mussten zunächst die in Abschnitt 3.5.1.1.1 und 3.5.1.1.2 beschriebenen Makros zur Analyse der Zelldichte und Intensität der Bewegung etabliert und optimiert werden.

4.1.1.1 Optimierung der Variablen des Zelldichte-Makros

Zur Optimierung des Zelldichte-Makros wurden zunächst die Zelldichten (% bewachsene Fläche) in vier Bildern aus verschiedenen Phasenkontrast-Zeitraffer-Filmen manuell gemessen. Die Variablen r , σ_S und P des Zelldichte-Makros (s. Abschnitt 3.5.1.1) wurden dann so angepasst, dass sie die Ergebnisse der manuellen Messungen möglichst genau reproduzierten. Abbildung 4.1 A vergleicht die Ergebnisse aller verwendeten Kombinationen von Variablen mit den manuellen Messungen. Für jede Analyse ist der Mittelwert incl. Standardabweichung der Zelldichten in allen vier Bildern aufgetragen. In Tabelle A.2 im Anhang sind die Werte aus Abbildung 4.1 A aufgelistet. Abbildung 4.1 B zeigt für eines der Phasenkontrast-Bilder die manuelle Quantifizierung sowie die Ergebnis-Bilder, welche das Zelldichte-Makro mit $r = 3$ Pixel, $\sigma_S = 5,5\%$ und $P = 250$ Pixel erbrachte. Die Darstellung des σ_S -Bildes ist dabei so gewählt, dass σ_S -Werte über 50% nicht mehr unterscheidbar sind. σ_S -Werte über 50% wurden nur in ca. 0,1% des Bildes erreicht. Diese Einschränkung wurde daher zugunsten eines verbesserten Kontrastes in Kauf genommen.

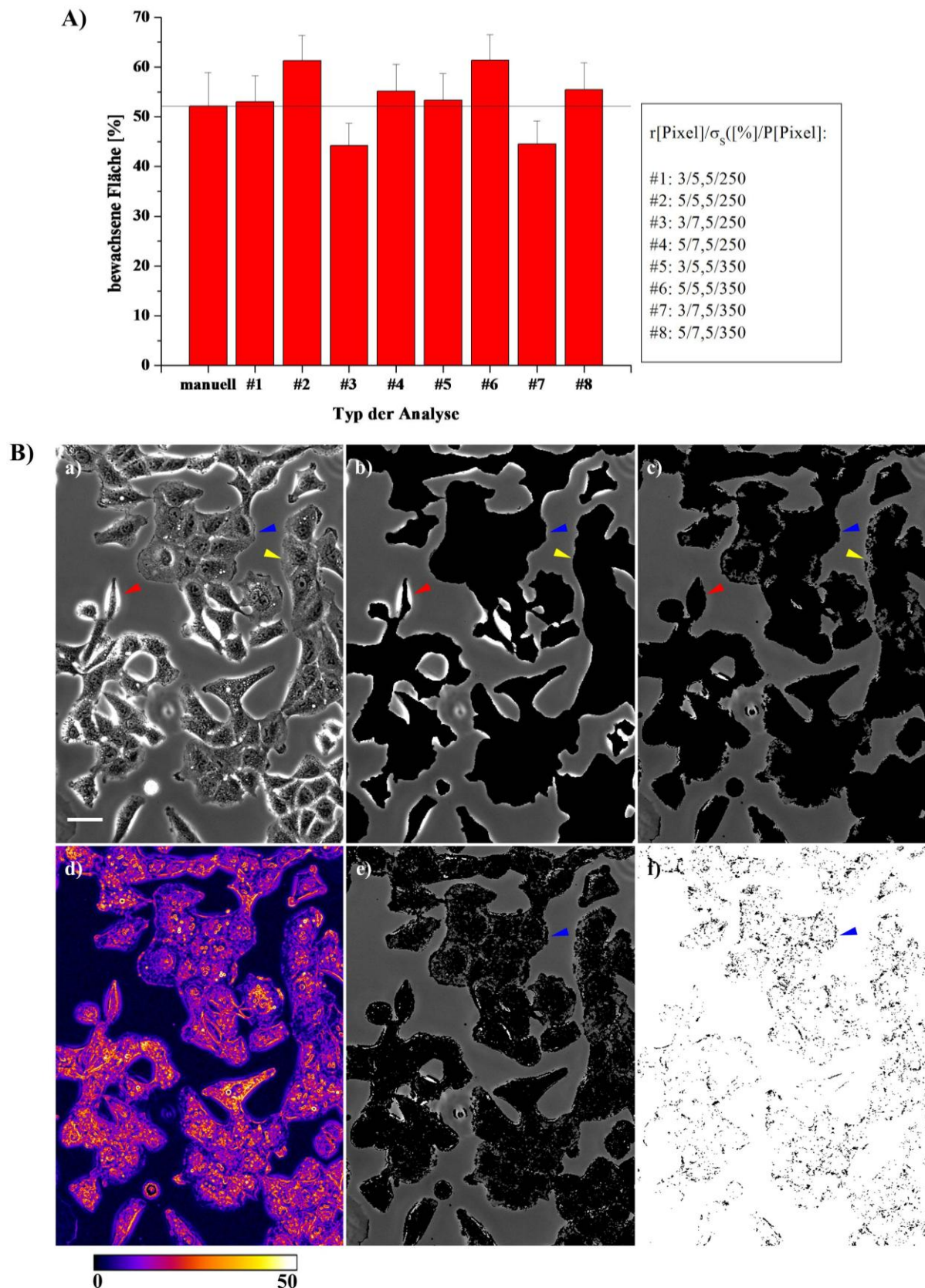


Abbildung 4.1: Optimierung des Zelldichte-Makros für die Phasenkontrast-Zeitraffer-Filme. Die Zelldichten in vier Bildern aus verschiedenen Phasenkontrast-Zeitraffer-Filmen von A549-Zellen wurden mit dem Zelldichte-Makro mit acht verschiedenen Kombinationen von Variablen sowie manuell gemessen. A) Mittelwerte und Standardabweichungen der Zelldichten aus den vier Bildern für alle Quantifizierungen. Verwendete Variablen des Zelldichte-Makros sind in der Legende angegeben.

(Fortsetzung der Bildunterschrift auf der folgenden Seite)

(Fortsetzung der Bildunterschrift zu Abbildung 4.1 auf der vorigen Seite) B) Exemplarische Resultate eines Quantifizierungs-Vergleiches: a) Eines der zu quantifizierenden Phasenkontrast-Bilder; b) manuelle Quantifizierung der bewachsenen Fläche; c)-f): Ergebnis-Bilder der automatischen Zelldichte-Analyse mit Variablen-Kombination #1 aus A), davon c): brutto-Bild; d) σ_S -Bild; e) netto-Bild; f) Mindestgrößen-Bild. Rote Pfeilspitzen: Stark kontrastierter Hintergrund, fälschlicherweise als bewachsen klassifiziert; gelbe Pfeilspitzen: schwach kontrastierte Zellflächen, fälschlicherweise als unbewachsen klassifiziert; blaue Pfeilspitzen: schwach kontrastierte Zellflächen, nach Mindestgröße-Kriterium dennoch als bewachsen klassifiziert. Maßstabsbalken entspricht 40 μm .

Abbildung 4.1 A zeigt, dass das Zelldichte-Makro die Zelldichte in den Bildern abhängig von den gesetzten Variablen unterschiedlich quantifizierte. Die geringste Abweichung von der manuellen Quantifizierung wurde durch die Kombination der Variablen $r = 3$ Pixel, $\sigma_S = 5,5\%$ und $P = 250$ Pixel erhalten. Das Zelldichte-Makro klassifizierte sehr ähnliche Flächen als bewachsen wie die manuelle Kontrolle (Abbildung 4.1 B). Die Pfeilspitzen zeigen typische Quantifizierungsfehler des Makros sowie den korrigierenden Effekt des Mindestgrößen-Kriteriums: Die roten Pfeilspitzen weisen auf eine Stelle, an der in der Nähe einer stark gewölbten Zelle der Hintergrund starken Kontrast zeigt und daher fälschlicherweise als bewachsen klassifiziert wurde. Die gelben Pfeilspitzen weisen auf eine Stelle, an der stark ausgebreitete Zellen so geringen Kontrast aufweisen, dass Teile ihrer Fläche fälschlicherweise als unbewachsen klassifiziert wurden. Die Genauigkeit des Makros profitiert von der Tatsache, dass beide Fehler entgegengesetzt wirken und sich daher tendenziell gegenseitig aufheben. Die blauen Pfeilspitzen weisen auf eine ähnliche Stelle, an der jedoch die Flächen mit geringem Kontrast so klein sind, dass sie nach dem Mindestgrößen-Kriterium dennoch richtig als bewachsen klassifiziert wurden.

Die Zelldichten in elf weiteren Bildern aus verschiedenen Phasenkontrast-Zeitraffer-Filmen wurden dann automatisch mit der besten Kombination von Variablen sowie manuell gemessen. Somit lagen für insgesamt 15 Bilder sowohl manuelle, als auch optimierte automatische Messungen der Zelldichte vor. Die Differenz zwischen automatisch und manuell gemessenen Zelldichten betrug durchschnittlich $0,61 \pm 2,73\%$ des Gesichtsfeldes.

Im Folgenden wurde zur Quantifizierung der Zelldichte in Phasenkontrast-Bildern das Zelldichte-Makro mit den Variablen $r = 3$ Pixel, $\sigma_S = 5,5 \%$ und $P = 250$ Pixel verwendet.

4.1.1.2 Das Zelldichte-Makro ist gegenüber der Helligkeit der analysierten Bilder robust

Es sollte überprüft werden, inwieweit die Ergebnisse des Zelldichte Makros von der durchschnittlichen Helligkeit der analysierten Bilder abhängig waren. Dazu wurden Phasenkontrast-Bilder lebender A549-Zellen aufgezeichnet. Jedes Gesichtsfeld wurde mehrfach aufgezeichnet und dabei die Helligkeit variiert, indem die Durchlicht-Lampe mit verschiedenen Spannungen betrieben wurde. Es wurden drei verschiedene Gesichtsfelder

aufgezeichnet und die Zelldichten für jede Helligkeit mit dem Zelldichte-Makro quantifiziert. Abbildung 4.2 zeigt für jedes Gesichtsfeld die erhaltenen Zelldichte-Werte, aufgetragen gegen die mittlere Helligkeit des analysierten Bildes.

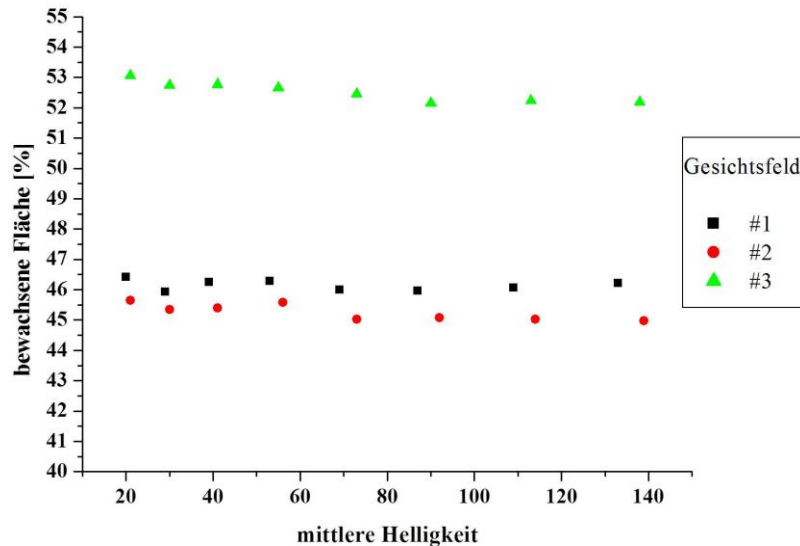


Abbildung 4.2: Das Zelldichte-Makro ist gegenüber der Helligkeit der zu analysierenden Bilder unempfindlich. Die Zelldichten in drei Gesichtsfeldern, von denen jeweils mehrere Phasenkontrast-Bilder mit unterschiedlicher Helligkeit aufgezeichnet wurden, wurden mit dem Zelldichte-Makro quantifiziert. Gemessene Zelldichten sind gegen die Helligkeit der jeweiligen Bilder aufgetragen.

Die mit dem Zelldichte-Makro ermittelten Zelldichten waren für jedes der drei Gesichtsfelder über einen breiten Helligkeitsbereich nahezu konstant. Alle beobachteten Differenzen lagen unter 1% der Gesamtgröße des Gesichtsfeldes (Abbildung 4.2).

4.1.1.3 Optimierung des Schwellenfaktors des Bewegungs-Makros

Bewegt sich eine Zelle zwischen zwei Bildern eines Phasenkontrast-Zeitraffer-Films, so ändern dadurch jene Bildpixel, die die Zelle abbilden, mit hoher Wahrscheinlichkeit ihre Helligkeit. Der Schwellenfaktor des Bewegungs-Makros gibt jenen Faktor an, ab dem das Makro Helligkeitsänderungen einzelner Pixel als Bewegung interpretiert. An einem Phasenkontrast-Zeitraffer-Film HGF-stimulierter A549-Zellen wurden Bewegungs-Analysen mit unterschiedlichen Schwellenfaktoren (s. Abschnitt 3.5.1.1.1) durchgeführt. Abbildung 4.3 zeigt die Ergebnisse, die mit den Schwellenfaktoren 2,00, 1,67, 1,33, 1,17 und 1,10 erhalten wurden. Abbildung 4.3 A zeigt die gemessene Bewegung in % der bewachsenen Fläche, aufgetragen gegen die Zeit, Abbildung 4.3 B zeigt, ebenfalls aufgetragen gegen die Zeit, die relative Bewegung, die auf den jeweiligen Wert bei $t = 0$ normalisiert ist. $t = 0$ bezeichnet den Zeitpunkt unmittelbar vor HGF-Zugabe.

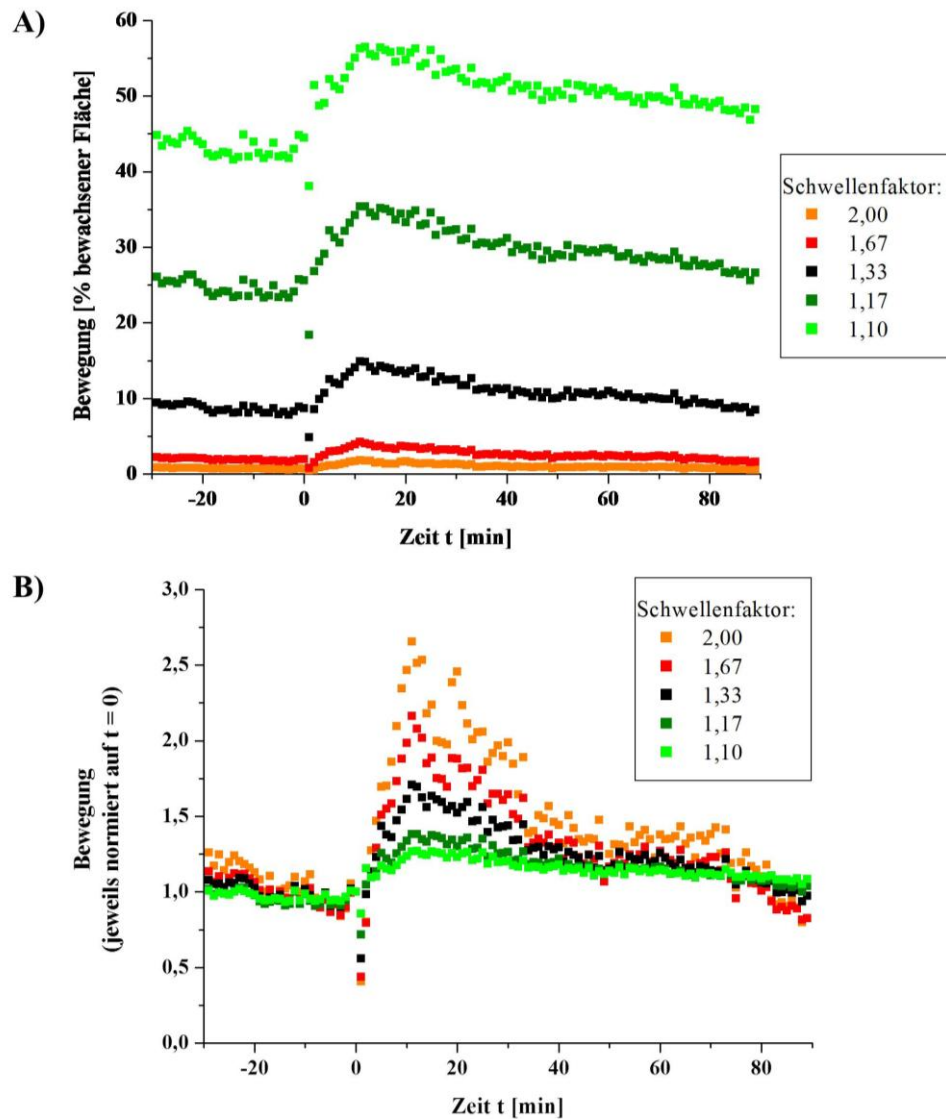


Abbildung 4.3. Ein optimaler Schwellenfaktor im Bewegungs-Makro liefert Ergebnisse, die sich für unterschiedliche Auftragungsarten eignen: Ein Phasenkontrast-Zeittraffer-Film HGF-stimulierter A549-Zellen wurde mit dem Bewegungs-Makro mit unterschiedlichen Schwellenfaktoren (s. Legende) analysiert. Die Ergebnisse sind gegen die Zeit t aufgetragen; $t = 0$ entspricht dem letzten Bild vor Zugabe des HGF. A) Bewegung in % der bewachsenen Fläche. B) Relative Bewegung, normalisiert auf den jeweiligen Wert bei $t = 0$.

Das Bewegungs-Makro quantifizierte einen umso größeren Anteil der bewachsenen Fläche als bewegt, je geringer der Schwellenfaktor gewählt wurde (Abbildung 4.3 A). Dieser Anteil war für die großen Schwellenfaktoren 2,00 und 1,67 so gering, dass die gewonnenen Daten in der normalisierten Darstellung starkem Rauschen unterworfen waren (Abbildung 4.3 B). Dagegen war der als bewegt quantifizierte Anteil bewachsener Fläche für die kleinen Schwellenfaktoren 1,10 und 1,17 so groß, dass durch die HGF-Stimulation nur ein geringer relativer Anstieg der gemessenen Bewegungs-Werte zu verzeichnen war. Im Folgenden wurden Analysen mit dem Bewegungs-Makro daher mit einem Schwellenfaktor von 1,33 durchgeführt.

4.1.2 RhoA wird in A549-Zellen HGF-abhängig transient reguliert

A549-Zellen wurden für HGF-Behandlung mit anschließendem RhoA-Aktivitäts-Pulldown in 10 cm-Kulturschalen ausgesät. Am Tag des Pulldowns wurden die Zellen zeitlich versetzt mit HGF stimuliert, so dass die anschließend durchgeführten RhoA-Aktivitäts-Pulldowns die Zeitpunkte 120, 60, 30 und 10 min nach HGF-Behandlung sowie den Zustand unstimulierter Zellen erfassten. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Abbildung 4.4 A zeigt exemplarisch für ein Experiment die eingesetzte Menge an GST-RBD (Ponceau S-gefärbte Banden nach dem Western Blot) sowie die mittels Immundetektion sichtbar gemachten Proteinbanden von α -Tubulin und RhoA. Abbildung 4.4 B zeigt für jedes Lysat die Menge an aktivem RhoA sowie den Anteil aktiven RhoAs am Gesamt-RhoA, die Mengen an Gesamt-RhoA und α -Tubulin sowie den mittels Bradford-Test bestimmten Gesamt-Proteingehalt. Alle Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Wert ohne HGF-Behandlung. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus den drei Experimenten gegen die jeweilige Dauer der HGF-Behandlung. In Tabelle A.3 im Anhang sind die Werte aus Abbildung 4.4 B sowie die ebenfalls normalisierten Gesamt-Protein- und α -Tubulin-Gehalte der Lysate aufgelistet.

Aus Tabelle A.3 wird ersichtlich, dass sich die fünf Lysate, die pro Pulldown miteinander verglichen wurden, jeweils in Gesamt-Protein- und α -Tubulin-Gehalt sehr ähnlich waren. Beide Werte korrelierten auch stark miteinander, was die Vitalität der Zellen bestätigt. Abbildung 4.4 B zeigt einen gegensätzlichen Verlauf von RhoA-Aktivität und Gesamt-RhoA-Menge infolge der HGF-Behandlung: Die Gesamtmenge an RhoA sank infolge der HGF-Stimulation ab, erreichte 30 min nach der Zugabe ein Minimum und stieg im Zeitraum bis 120 min nach der Zugabe wieder nahezu auf den Wert unbehandelter Zellen an. Im Gegensatz dazu stieg die Menge aktiven RhoAs nach HGF-Zugabe leicht an und lag 120 min nach der Zugabe immer noch über dem Wert unbehandelter Zellen. Der Anteil aktiven RhoAs am Gesamt-RhoA stieg nach HGF-Zugabe deutlich an, erreichte sein Maximum 60 min nach der Zugabe und sank danach wieder ab. 120 min nach HGF-Zugabe lag der Wert jedoch immer noch über dem Wert unbehandelter Zellen. Für diese Größe unterschied sich nur der Wert 10 min nach HGF-Zugabe signifikant vom Wert unbehandelter Zellen.

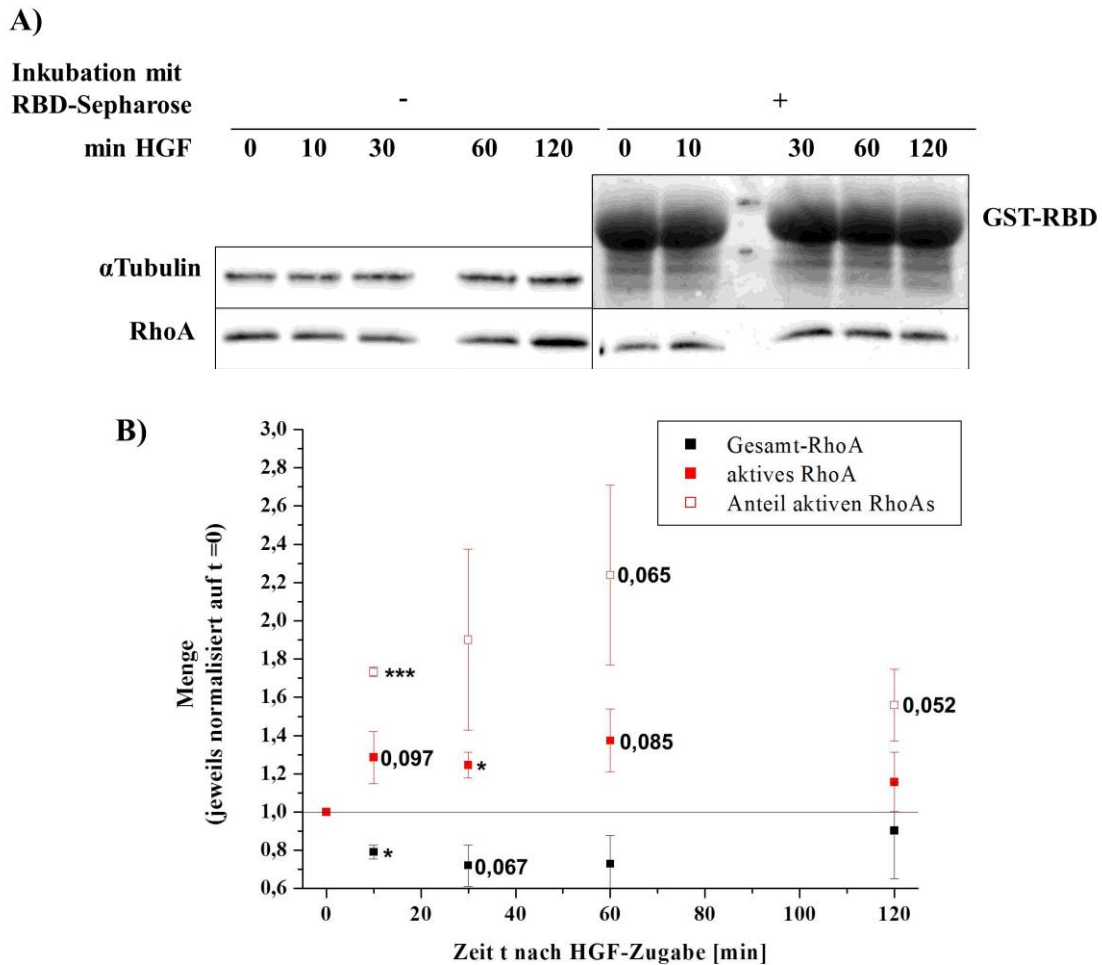


Abbildung 4.4: Ergebnisse der RhoA-Aktivitäts-Pulldowns an HGF-stimulierten A549-Zellen. RhoA-Aktivitäts-Pulldowns wurden an A549-Zellen 10, 30, 60 und 120 min nach Behandlung mit HGF sowie ohne vorherige Behandlung mit HGF durchgeführt. A) Rechts oben: Ponceau S-gefärbte GST-RBD-Banden nach dem Western Blot; alle anderen Banden sind Immundetektionen: links oben: α -Tubulin aus den Proben zur Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehaltes; links unten: RhoA aus den Proben zur Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehaltes; rechts unten: aktives RhoA aus den Sepharose-inkubierten Proben. Zuordnung der Spuren oberhalb der Banden. B) Graphische Darstellung der Ergebnisse der RhoA-Aktivitäts-Pulldowns: Menge aktiven RhoAs (ausgefüllt rot), Anteil aktiven RhoAs (leer rot) und Menge an Gesamt-RhoA (schwarz), aufgetragen gegen die Dauer der HGF-Behandlung. Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Wert ohne HGF-Behandlung. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Für nicht-signifikante Unterschiede mit p-Werten zwischen 0,1 und 0,05 sind diese als Zahl angegeben, p-Werte signifikanter Unterschiede: * $\leq 0,05$; *** $\leq 0,001$.

4.1.3 Rolle des RhoA-GAPs p190A in der HGF-Reaktion von A549-Zellen

4.1.3.1 Test verschiedener siRNAs zur Depletion von p190A

Vorversuche (nicht gezeigt) mit den p190A-spezifischen siRNAs siGRLF1#7 und #8, deren Wirkung nach Angaben des Herstellers Qiagen validiert ist, zeigten deutliche cytotoxische Effekte von siGRLF1#8: Zellen, die mit dieser siRNA transfiziert worden waren, proliferierten nicht nur deutlich weniger, ihr Anteil an α -Tubulin-Gehalt am Gesamt-Protein war auch deutlich verringert. Sämtliche anderen p190A-spezifischen siRNAs von Qiagen

wurden daher auf die Effizienz der p190A-Depletion sowie auf ihre Cytotoxizität hin untersucht. Zur Depletion von p190A wurden A549-Zellen mit den p190A-spezifischen Einzel-siRNAs siGRLF1#1, #2, #3, #4 und #7 sowie nt-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden zur parallelen Gewinnung von Protein- und RNA-Lysaten replattiert und 72 h nach Transfektion lysiert. Die Proteinmengen wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion quantifiziert. Die Analyse der relativen mRNA-Gehalte erfolgte mittels qPCR. Abbildung 4.5 A zeigt für eines von drei unabhängigen Experimenten die mittels Immundetektion sichtbar gemachten Proteinbanden von α -Tubulin und p190A. Abbildung 4.5 B zeigt für jede siRNA-Transfektion den mittels Bradford-Test bestimmten Gesamt-Proteingehalt des Proteinlysats, der als Maß für die Cytotoxizität der siRNA betrachtet wurde, die mittels Western Blot bestimmten Mengen an α -Tubulin und p190A sowie die mittels qPCR bestimmte Menge an p190A-mRNA. Alle Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Wert nach nt-siRNA-Transfektion. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus den drei Experimenten.

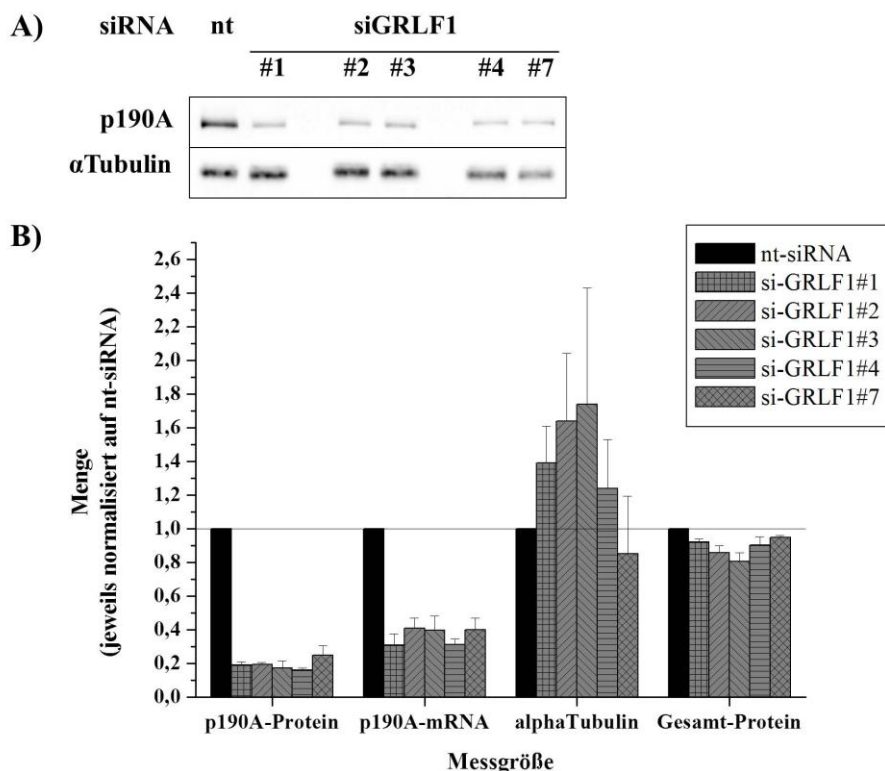


Abbildung 4.5: p190A-Depletion mit fünf verschiedenen Einzel-siRNAs. A549-Zellen wurden mit nt-siRNA oder mit den p190A-spezifischen siRNAs siGRLF1#1, #2, #3, #4 oder #7 transfiziert. Protein- und mRNA-Gehalt der Zellen 72 h nach der Transfektion wurden analysiert. A) Oben: Immundetektion der p190A-Banden; unten: Immundetektion der α -Tubulin-Banden. Zuordnung der Spuren oberhalb der Banden. B) Von links nach rechts: p190A-Gehalt, Gehalt an p190A-mRNA, α -Tubulin-Gehalt und Gesamt-Proteingehalt der verschiedenen Lysate. Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Wert nach nt-siRNA-Transfektion. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

In Tabelle A.4 im Anhang sind die Werte aus Abbildung 4.5 B aufgelistet. In Abbildung 4.5 B ist zu erkennen, dass sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene für alle p190A-spezifischen siRNAs ähnlich gute p190A-Depletionseffizienzen erzielt werden konnten. Auf Proteinebene war die Depletion durch siGRLF1#7 etwas schwächer als durch die anderen siRNAs, auf mRNA-Ebene war sie durch siGRLF1#1 und #4 etwas stärker. Für alle Transfektionen war die Depletion auf Proteinebene stärker als auf mRNA-Ebene: Der Anteil verbliebener mRNA war etwa 1,5-2 mal so groß wie der Anteil verbliebenen Proteins. Mit Ausnahme von siGRLF1#7 erhöhten alle p190A-spezifischen siRNAs den α -Tubulin-Gehalt der Zellen. Die Erhöhung war für siGRLF1#1 und #4 am geringsten. siGRLF1#7 verringerte den α -Tubulin-Gehalt der Zellen.

Als Resultat aus den oben beschriebenen Versuchen wurde entschieden, für die phänotypische Charakterisierung der p190A-Depletion die siRNAs siGRLF1#1 und siGRLFs#4 sowie deren Mischung zu verwenden. Zur Charakterisierung der p190A-Depletion durch die Mischung von siGRLF1#1 und #4 wurden die oben beschriebenen Versuche mit nt-siRNA sowie siGRLF1#1, siGRLF1#4 und deren Mischung wiederholt. Die Endaufreinigung der RNA-Lysate, cDNA-Synthesen und qPCRs wurden für zwei der drei Experimente freundlicherweise von Alexandra Blancke Soares (zu jenem Zeitpunkt Universität Duisburg-Essen, Abteilung für Molekulare Zellbiologie) im Rahmen eines Praktikums durchgeführt. Abbildung 4.6 zeigt für jede siRNA-Transfektion die Menge an p190A-mRNA sowie p190A. Die Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Wert nach nt-siRNA-Transfektion. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus den drei Experimenten. In Tabelle A.5 im Anhang sind die Werte aus Abbildung 4.6 aufgelistet.

Aus Abbildung 4.6 ist zu erkennen, dass die Depletion mit dem siRNA-Mix vergleichbar effizient war wie mit den Einzel-siRNAs. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene schien die Depletion zwar etwas geringer zu sein, doch war der Unterschied auf mRNA-Ebene sehr klein, auf Proteinebene war die Standardabweichung aus den drei Experimenten recht hoch und daher der beobachtete Unterschied wenig aussagekräftig. Wie schon in den Experimenten mit fünf verschiedenen p190A-spezifischen Einzel-siRNAs (vgl. Abbildung 4.5 B), war auch hier der Anteil verbliebener mRNA etwa 1,5 mal so groß wie der Anteil verbliebenen Proteins. Im Folgenden wurde die Depletion von p190A stets mit den Einzel-siRNAs siGRLF#1 und #4 sowie mit deren Mischung durchgeführt.

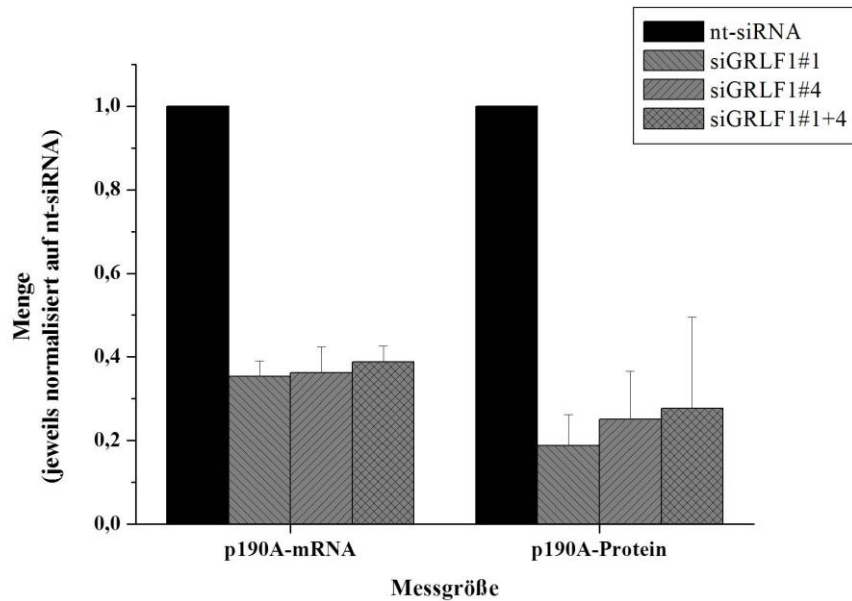


Abbildung 4.6: p190A-Depletion mit siGRLF1#1, #4 und deren Mischung. A549-Zellen wurden mit den p190A-spezifischen siRNAs siGRLF1#1, #4, deren Mischung oder mit nt-siRNA transfiziert. Protein- und mRNA-Gehalt der Zellen 72 h nach der Transfektion wurden analysiert. Links: p190A-mRNA-Gehalt; rechts: p190A-Gehalt. Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Wert nach nt-siRNA-Transfektion. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.3.2 Die Stärke der Reaktion von A549-Zellen auf HGF wird durch p190A-Depletion nicht beeinflusst

Es wurden Phasenkontrast-Zeitraffer-Filme von A549-Zellen aufgenommen, die mit nt-siRNA, siGRLF1#1 oder siGRLF1#4 sowie deren Mischung (siGRLF1#1+4) transfiziert waren. Der Mediumaustausch zur HGF-Stimulation erfolgte abseits des Probenisches. Für jede Transfektion wurden auch Filme aufgenommen, in denen die Zellen nicht mit HGF stimuliert wurden. In diesen Proben wurde kein Mediumaustausch vorgenommen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die p190A-Depletion wurde in jedem Experiment auf Proteinebene nachgewiesen. Transfektion mit siGRLF1#1+4 verringerte die p190A-Menge durchschnittlich auf $28,6 \pm 7,5\%$, Transfektion mit siGRLF1#1 durchschnittlich auf $33,2 \pm 15,7\%$ und Transfektion mit siGRLF1#4 durchschnittlich auf $31,4 \pm 11,4\%$ der Menge, die nach nt-siRNA-Transfektion nachgewiesen wurde. Die Stärke der HGF-Reaktion in den verschiedenen Proben wurde durch Bewegungs- und Zelldichten-Analyse (Abschnitte 3.5.1.1.1 und 3.5.1.1.2) der Phasenkontrast-Zeitraffer-Filme verglichen. Abbildung 4.7 zeigt die Ergebnisse der Bewegungs-Analysen: In beiden Teilabbildungen ist die Bewegung der verschiedenen Zellpopulationen gegen die Zeit t aufgetragen. Der Zeitpunkt der HGF-Stimulation wurde dabei als $t = 0$ gesetzt. In Abbildung 4.7 A ist die Bewegung der Zellen in % der bewachsenen Fläche aufgetragen, für Abbildung 4.7 B wurden

dieselben Bewegungsdaten auf den jeweiligen Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ normalisiert. Dargestellt ist für jeden Messpunkt der Mittelwert aus den drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichungen zwischen den Experimenten waren sehr groß: Die Standardabweichungen der nicht normalisierten Daten lagen für HGF-stimulierte Zellen bei durchschnittlich $\pm 0,7\%$ der bewachsenen Fläche, für nicht stimulierte sogar bei $\pm 1-1,5\%$ der bewachsenen Fläche. Die Standardabweichungen der normalisierten Daten lagen für HGF-stimulierte Zellen bei durchschnittlich $\pm 0,08$, für nicht stimulierte bei $\pm 0,03$. Sie sind in Abbildung 4.7 nicht dargestellt, um die Erkennbarkeit nicht zu beeinträchtigen.

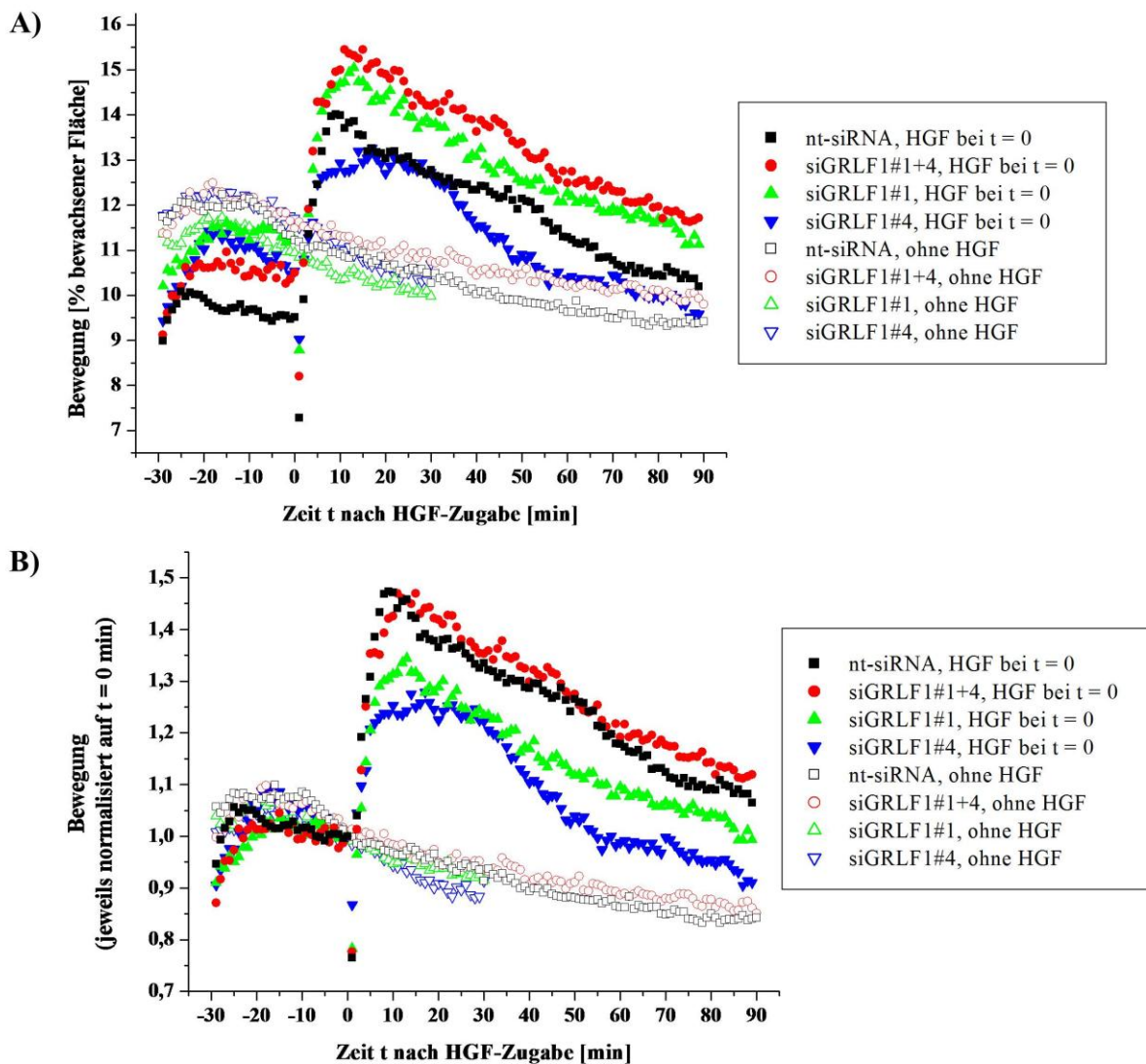


Abbildung 4.7: Die Stärke der HGF-Reaktion von A549-Zellen wird durch p190A-Depletion nicht beeinflusst. A549-Zellen wurden mit den p190A-spezifischen siRNAs siGRLF1#1, #4, deren Mischung oder mit nt-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden unstimulierte und HGF-stimulierte Zellen mittels Phasenkontrast-Zeitraffer-Mikroskopie untersucht. Die Stärke der Bewegungen wurde quantifiziert und gegen die Zeit t aufgetragen ($t = 0$ bezeichnet den Zeitpunkt der HGF-Zugabe). Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. A) Bewegungen sind in % bewachsener Fläche angegeben. B) Bewegungen jeder Population sind normalisiert auf Bewegung bei $t = 0$.

Aus Abbildung 4.7 ist erkennbar, dass sich p190A-depletierte A549-Zellen nach HGF-Stimulation ungefähr gleich stark bewegten wie nt-siRNA-transfizierte Zellen. Dabei ist in Abbildung 4.7 A die absolute Stärke der Bewegung angegeben. Sie erweckt den Eindruck, dass A549-Zellen, in denen p190A durch siGRLF1#1 oder siGRLF1#1+4 depletiert wurde, durch HGF-Behandlung mehr zu Bewegung angeregt wurden als nt-siRNA-behandelte Zellen. Allerdings bewegten sich diese Zellen auch schon vor der HGF-Stimulation stärker als die Kontrollzellen. Für Zellen, die während des gesamten Experiments nicht mit HGF stimuliert wurden, trat jedoch kein vergleichbarer Unterschied auf. Es scheint sich also lediglich um eine Abweichung der experimentellen Bedingungen zu handeln, deren genaue Natur nicht bekannt ist. Aus Abbildung 4.7 B geht die relative Verstärkung der Zellbewegung durch HGF-Stimulation hervor. Daraus wird ersichtlich, dass sowohl in nt-siRNA- als auch in siGRLF1#1+4-transfizierten Zellen die Bewegungen nach HGF-Behandlung innerhalb von ca. 10 min auf das ca. 1,5fache des Wertes vor HGF-Zugabe anstiegen und sich anschließend auch für beide Populationen gleichermaßen wieder abschwächten. Diese relative Verstärkung der Bewegung fiel für Zellen, die mit einer p190A-spezifischen Einzel-siRNA transfiziert wurden, etwas geringer aus, war jedoch ebenfalls nicht signifikant.

4.1.3.3 RhoA-Aktivitäts-Pulldowns p190A-depletierter A549-Zellen liefern einen Hinweis darauf, dass p190A an der HGF-abhängigen Regulation von RhoA beteiligt sein könnte

Für RhoA-Aktivitäts-Pulldowns p190A-depletierter Zellen wurden nt-siRNA- bzw. siGRLF1#1+4-behandelte Zellen 120 min, 60 min, 30 min und 10 min vor der Lyse mit HGF behandelt; als Kontrolle blieben auch jeweils Zellen unbehandelt. siGRLF1#1- bzw. #4-behandelte Zellen wurden 30 min vor der Lyse mit HGF behandelt sowie ebenfalls jeweils unbehandelte Zellen zur Kontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden lysiert, mit den Lysaten RhoA-Aktivitäts-Pulldowns durchgeführt und die Proteinmengen mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion quantifiziert. Abbildung 4.8 A zeigt die mittels Immundetektion sichtbar gemachten Proteinbanden von α -Tubulin und p190A nach dem Western Blot zum Nachweis der p190A-Depletion, in Tabelle A.6 im Anhang sind die Ergebnisse der Quantifizierung dieses Western Blots aufgelistet. Abbildung 4.8 B zeigt die Ponceau S-gefärbten GST-RBD-Banden nach dem Western Blot der Pulldown-Proben sowie die mittels Immundetektion sichtbar gemachten Proteinbanden von α -Tubulin und RhoA. Abbildung 4.8 C zeigt für jedes Lysat die Menge aktiven RhoAs, den Anteil aktiven RhoAs am Gesamt-RhoA und die Menge an Gesamt-RhoA, aufgetragen gegen die jeweilige Dauer

der HGF-Behandlung. Die Daten sind jeweils normalisiert auf die Menge desselben Proteins, die ohne HGF-Behandlung, jedoch nach Transfektion mit derselben siRNA gemessen wurde. In Tabelle A.7 im Anhang sind die Werte aus Abbildung 4.8 C sowie die ebenfalls normalisierten Gesamt-Protein- und α -Tubulin-Gehalte der Lysate aufgelistet.

Abbildung 4.8 C zeigt, dass die Ergebnisse der siGRLF1#1+4-transfizierten Zellen sich von denen der nt-siRNA-transfizierten Zellen unterschieden: Ihre Gesamt-RhoA-Menge sank nahezu nicht ab. Erst 2 h nach der HGF-Stimulation zeigte sie eine leichte Verringerung, lag aber immer noch über der nt-siRNA-behandelter Zellen zu jenem Zeitpunkt. Der Anteil aktiven RhoAs am Gesamt-RhoA stieg für beide Bedingungen nach der HGF-Zugabe transient an, für siGRLF1#1+4-transfizierte Zellen war der Anstieg jedoch geringer. Allerdings waren die nachgewiesenen absoluten Mengen aktiven RhoAs für nt-siRNA- und siGRLF1#1+4-transfizierte Zellen zu jedem Zeitpunkt nach HGF-Zugabe nahezu identisch. Auch zeigt Tabelle A.7, dass in diesem Experiment die Mengen an α -Tubulin in den Proben kaum mit deren Gesamt-Proteingehalt korrelierten. Die α -Tubulin-Mengen, die zur Normalisierung des Gesamt-RhoAs genutzt wurden, könnten also ungenau bestimmt oder durch externe Einflüsse auf die Zellen verändert worden sein, so dass die Aussagekraft des Experimentes möglicherweise eingeschränkt ist. Die Ergebnisse, die für siGRLF1#4-behandelte Zellen erhoben wurden, korrelierten ebenfalls nicht in allen Messgrößen mit denen der siGRLF1#1+4- oder siGRLF1#1-transfizierten Zellen (nur 30 min-Messpunkt). Auch das erschwert die Interpretation der Daten, da anhand der vorliegenden Daten nicht entschieden werden kann, welche Probe den Effekt der p190A-Depletion am zuverlässigsten wiedergibt. Das Experiment sollte wiederholt werden, um den beobachteten Effekt der p190A-Depletion auf die RhoA-Gesamtmenge bestätigen oder widerlegen zu können.

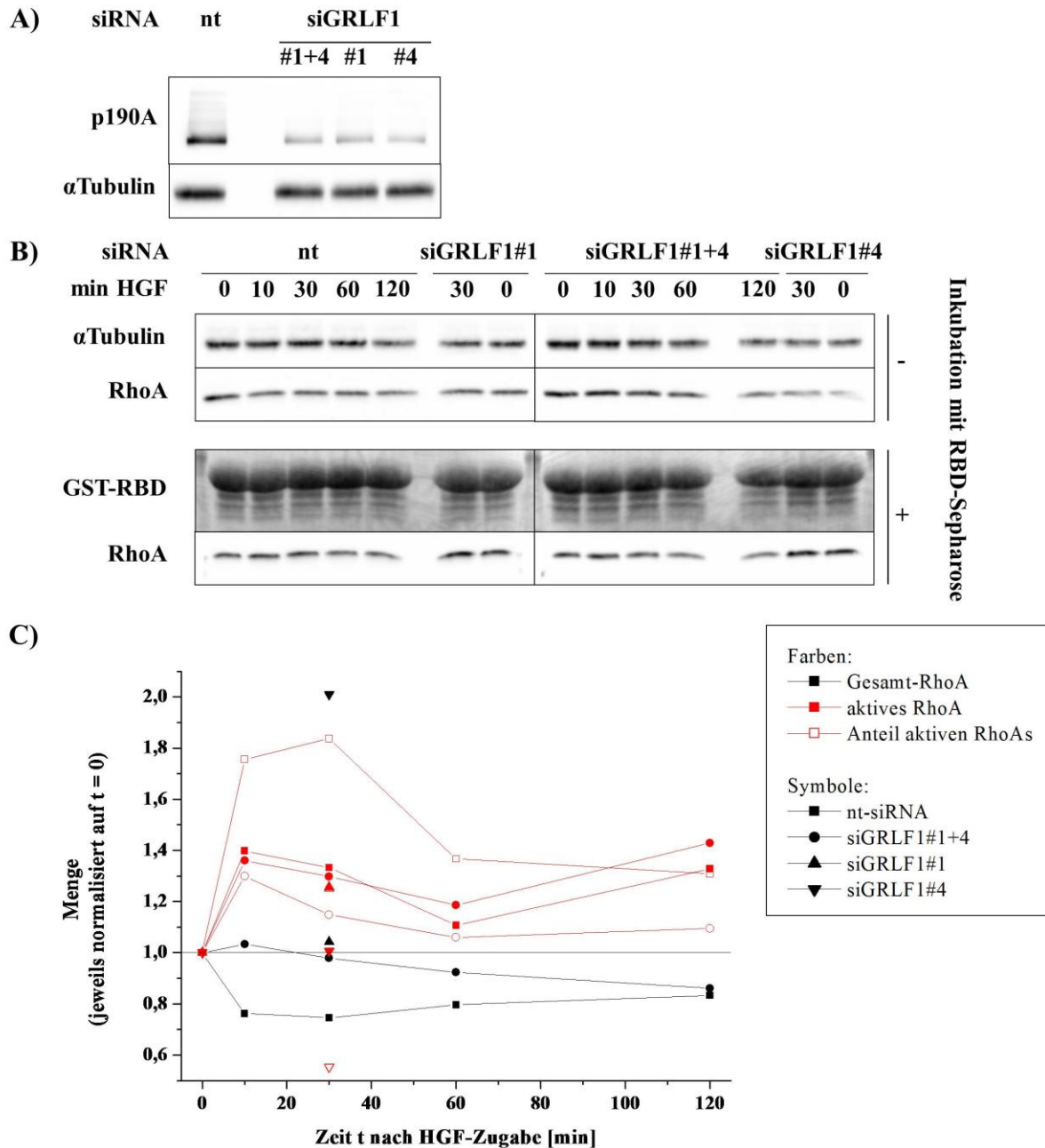
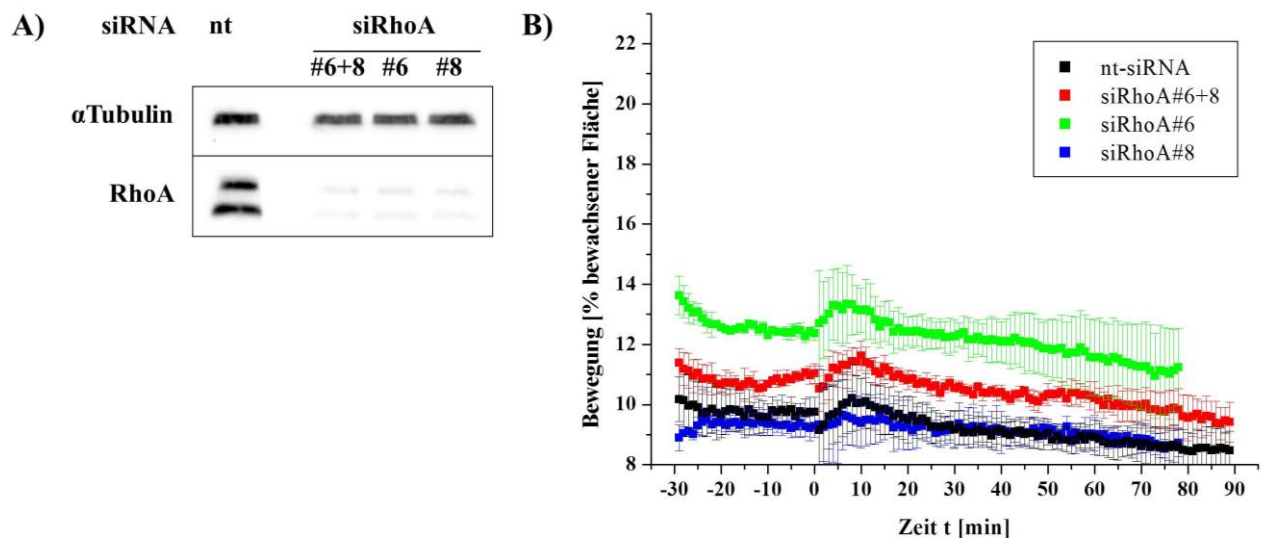


Abbildung 4.8: Ergebnisse der RhoA-Aktivitäts-Pulldowns an p190A-depletierten, HGF-stimulierten A549-Zellen. A549-Zellen wurden mit den p190A-spezifischen siRNAs siGRLF1#1, #4, deren Mischung oder mit nt-siRNA transfiziert. Vor den RhoA-Aktivitäts-Pulldowns wurden die Zellen 0, 10, 30, 60 oder 120 min mit HGF stimuliert. A) Nachweis der p190A-Depletion auf Proteinebene: Oben: Immundetektion der p190A-Banden; unten: Immundetektion der α -Tubulin-Banden. Zuordnung der Spuren oberhalb der Banden. B) Ergebnisse der Pulldowns: Oben: Immundetektion der α -Tubulin- und RhoA-Banden aus den Proben zur Bestimmung des Gesamt-RhoA-Gehaltes; unten: Ponceau S-gefärbte GST-RBD-Banden nach dem Western Blot und Immundetektion der RhoA-Banden aus den Sepharose-inkubierten Proben. Zuordnung der Spuren oberhalb der Banden. C) Menge aktiven RhoAs (ausgefüllt rot), Anteil aktiven RhoAs am Gesamt-RhoA (leer rot) und Menge an Gesamt-RhoA (schwarz), aufgetragen gegen die Dauer der HGF-Behandlung. Verschiedene Symbole stehen für Transfektion mit verschiedenen siRNAs; Zuordnung s. Legende. Daten sind jeweils normalisiert auf die Menge desselben Proteins, die ohne HGF-Behandlung, jedoch nach Transfektion mit derselben siRNA gemessen wurde.

4.1.4 Die Bewegung HGF-stimulierter A549-Zellen nach RhoA-Depletion

Der Einfluss von RhoA-Depletion auf die Bewegungen von A549-Zellen nach HGF-Stimulation sollte untersucht werden. Dazu wurden Phasenkontrast-Zeitraffer-Filme von A549-Zellen aufgenommen, die mit nt-siRNA, siRhoA#6+8, siRhoA#6 oder siRhoA#8 transfiziert waren. Der Mediaumaustausch zur HGF-Stimulation erfolgte auf dem Probentisch. Für jede Transfektion wurden auch Filme aufgenommen, in denen die Zellen nicht mit HGF stimuliert wurden. In diesen Proben wurde als Kontrolle dennoch ein Mediaumaustausch vorgenommen, jedoch ohne HGF-Zusatz. Die Stärke der HGF-Reaktion in den verschiedenen Proben wurde durch Bewegungs- und Zelldichten-Analyse der Filme verglichen.

Abbildung 4.9 zeigt die Ergebnisse der Bewegungs-Analysen: Teilabbildung A zeigt exemplarisch für eines von drei Experimenten die mittels Immundetektion sichtbar gemachten Proteinbanden von α -Tubulin und RhoA nach dem Western Blot zum Nachweis der RhoA-Depletion. Die Effizienz der RhoA-Depletion ist Tabelle A.8 im Anhang zu entnehmen. In den Teilabbildungen B-D der Abbildung 4.9 sind die Bewegungen verschiedener Zellpopulationen gegen die Zeit t aufgetragen. Dabei entspricht $t = 0$ dem letzten gemessenen Zeitpunkt vor HGF-Stimulation bzw. Mediumwechsel. In Abbildung 4.9 B ist die Bewegung unstimulierter Zellen in % der bewachsenen Fläche aufgetragen, in Abbildung 4.9 C die Bewegung HGF-stimulierter Zellen. Auch Abbildung 4.9 D zeigt die Bewegung HGF-stimulierter Zellen, jedoch wurden hier alle Daten auf den jeweiligen Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ normalisiert. Dargestellt ist für jeden Messpunkt der Mittelwert mit Standardabweichung aus den drei unabhängigen Experimenten.



(weitere Abbildungsteile und Bildunterschrift auf der folgenden Seite)

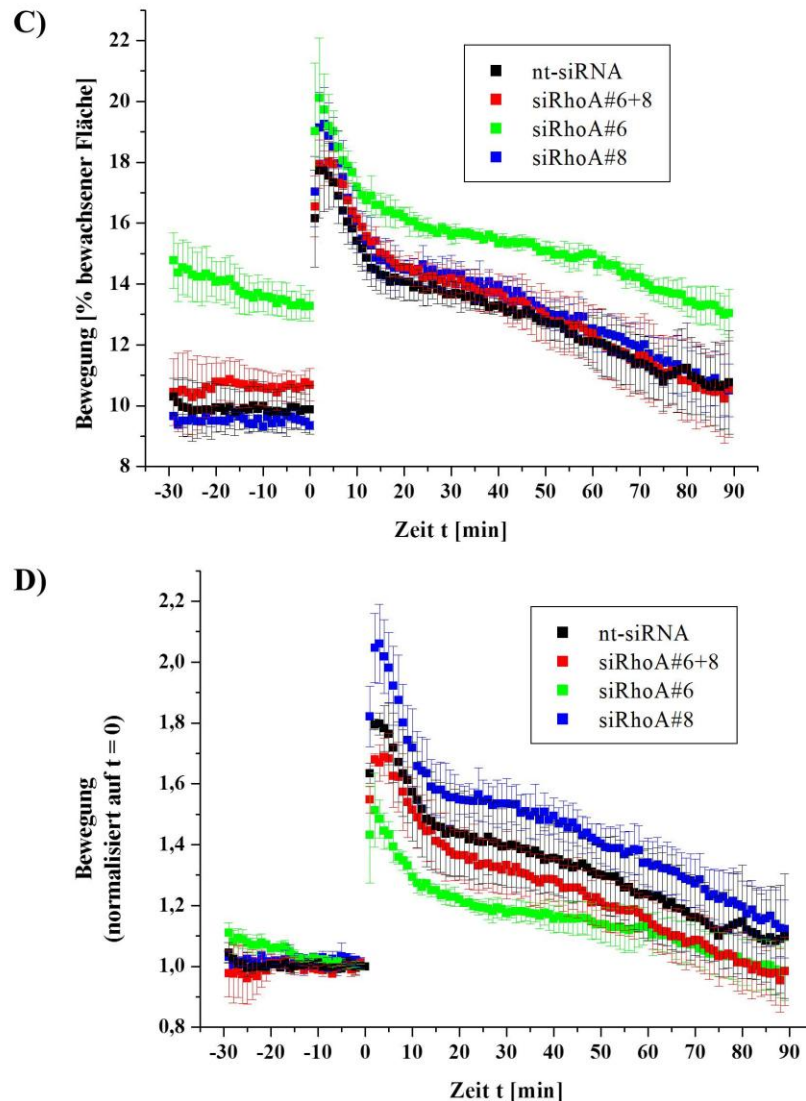


Abbildung 4.9: Bewegung HGF-stimulierter A549-Zellen nach RhoA-Depletion. A549-Zellen wurden mit den RhoA-spezifischen siRNAs siRhoA#6, #8, deren Mischung oder mit nt-siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurden unstimulierte und HGF-stimulierte Zellen mittels Phasenkontrast-Zeitraffer-Mikroskopie untersucht. (Abbildungsteile A) und B) auf der vorigen Seite) A) Nachweis der RhoA-Depletion auf Proteinebene; exemplarisch für drei Experimente: Oben: Immundetektion der α -Tubulin-Banden; unten: Immundetektion der RhoA-Banden. Zuordnung der Spuren oberhalb der Banden. B)-D) Die Stärke der Bewegungen in den Phasenkontrast-Zeitraffer-Filmen wurde quantifiziert und gegen die Zeit t aufgetragen (t = 0: Zeitpunkt unmittelbar vor HGF-Zugabe bzw. Mediumwechsel). Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. B) Bewegungen unstimulierter Zellen in % bewachsener Fläche. C) Bewegungen HGF-stimulierter Zellen in % bewachsener Fläche. D) Bewegungen HGF-stimulierter Zellen, jeweils normalisiert auf Bewegung bei t = 0.

Aus Abbildung 4.9 A und Tabelle A.8 im Anhang ist ersichtlich, dass die RhoA-Depletion durch jede der RhoA-spezifischen siRNAs bei über 95% lag. Ebenso wurde durch diese siRNAs der α -Tubulin-Gehalt herabgesetzt; dieser Effekt war für die Mischung beider siRNAs jedoch schwach im Vergleich zu denen der Einzel-siRNAs. Es scheint daher, dass die Einzel-siRNAs neben der RhoA-Depletion noch weitere Veränderungen in den Zellen bewirkten. Abbildung 4.9 B zeigt, dass siRhoA#6-transfizierte A549-Zellen sich stärker

bewegten als alle anderen Zellen in diesen Experimenten. Vor dem Mediumaustausch war der Unterschied zu allen anderen Populationen signifikant. Nach dem Mediumaustausch blieb der Bewegungs-Unterschied der siRhoA#6-transfizierten Zellen zu nt-siRNA- und siRhoA#8-transfizierten Zellen noch für ca. 50 min signifikant (nicht gezeigt), obgleich der Mediumaustausch die Standardabweichungen in allen drei Populationen erhöht hatte. Zellen, die mit siRhoA#6+8 transfiziert wurden, bewegten sich ebenfalls stärker als nt-siRNA- und siRhoA#8-transfizierte Zellen. Der Unterschied zu den siRhoA#8-transfizierten Zellen war vor dem Mediumaustausch nahezu durchgängig signifikant. Nach dem Mediumaustausch war die Bewegung der siRhoA#6+8-transfizierten Zellen gegenüber denen von nt-siRNA- und siRhoA#8-transfizierten Zellen zumindest zeitweise signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu wurden zwischen den beiden letztgenannten Populationen keine Unterschiede in der Bewegung beobachtet. Abbildung 4.9 C macht deutlich, dass auch nach HGF-Stimulation die siRhoA#6-transfizierten Zellen die stärksten Bewegungen zeigten. Die Bewegungen aller anderen Populationen waren nach HGF-Behandlung nicht unterscheidbar. Während der ersten Minuten der HGF-Reaktion wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Aus Abbildung 4.9 D geht die relative Verstärkung der Zellbewegung durch HGF-Stimulation hervor. Daraus wird ersichtlich, dass die siRhoA#6-transfizierten Zellen ihre Bewegung durch die HGF-Stimulation am wenigsten verstärkten, die siRhoA#8-transfizierten Zellen dagegen am meisten. Dieser Unterschied in der Bewegungsverstärkung der beiden Populationen war sofort nach HGF-Zugabe für ca. 70 min signifikant. Nur für einen sehr kurzen Zeitraum (3-6 min) nach HGF-Zugabe war die Bewegungsverstärkung der siRhoA#6-transfizierten Zellen auch signifikant geringer als die nt-siRNA- und siRhoA#6+8-transfizierter Zellen. Die Bewegungsverstärkung der siRhoA#6+8-transfizierten Zellen zeigte somit einen intermediären Phänotyp zwischen denen, die bei siRhoA#6- und siRhoA#8-behandelten Zellen beobachtet wurden. Zusammenfassend bewirkt die RhoA-Depletion durch siRhoA#6 eher eine Bewegungsverstärkung der Zellen, sorgt aber auch dafür, dass der Bewegungszuwachs durch HGF-Stimulation geringer ausfällt. Der HGF-induzierte Bewegungszuwachs von Zellen, in denen RhoA mit siRhoA#8 depletiert wurde, ist dagegen tendenziell erhöht.

4.2 Charakterisierung des RhoA-Biosensors

Die Anwendung von RhoA-Aktivitäts-Biosensoren ermöglicht es, die intrazelluläre Verteilung der RhoA-Aktivität zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Biosensoren für RhoA verwendet, deren Fluorophore sich in Art und Anordnung unterschieden. Der hauptsächlich verwendete Biosensor trug das FRET-Paar

ECFP/Citrin (hier als CFP und YFP bezeichnet) in der Mitte des Konstrukts (Pertz *et al.*, 2006). Die generelle Bezeichnung „RhoA-Biosensor“ meint im Folgenden dieses Konstrukt bzw. Varianten davon, deren jeweilige strukturelle Besonderheiten dann zusätzlich genannt werden.

4.2.1 Vergleich zweier Methoden zur Verbesserung des SNR in mikroskopischen Bilddaten

Rauschen in mikroskopischen Bilddaten beeinträchtigt die Ergebnisse ratiometrischer Bildanalysen (Wang, 2007; zur Veranschaulichung s. Abbildung A.1 im Anhang). Zur Etablierung der Arbeiten mit dem RhoA-Biosensor am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop wurde zunächst geprüft, wie sich verschiedene Methoden zur SNR-Verbesserung mikroskopischer Bilddaten auf die Ergebnisse der Bildanalysen auswirken. Die beiden gewählten Methoden waren der seit langem etablierte Gauss-Filter sowie das PureDenoise-Makro (Luisier *et al.*, 2011) für ImageJ.

4.2.1.1 Manuelle Messung der Rausch-Kenngrößen des verwendeten konfokalen Laser-Raster-Mikroskops bei verschiedenen Einstellungen

Das PureDenoise-Makro benötigt zur SNR-Verbesserung mikroskopischer Bilddaten drei charakteristische Rausch-Kenngrößen der Bilder (Luisier *et al.*, 2011). Diese Rausch-Kenngrößen wurden für das verwendete konfokale Laser-Raster-Mikroskop manuell gemessen. Dazu wurde das homogene Signal von Fluorophor-Lösungen verwendet (3.4.3). Von jeder Fluorophor-Lösung wurden Bilder dreier zufällig gewählter Positionen mit jeweils sechs verschiedenen Mikroskop-Einstellungen aufgezeichnet, die individuelle Rausch-Kenngrößen erwarten ließen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Abbildung 4.10 zeigt exemplarisch die Auftragung der Varianz gegen die Helligkeit in Bildern, die in einem der Experimente mit *Line Average* 4 und einer Scan-Geschwindigkeit von 100 Hz aufgezeichnet wurden. Tabelle 4.1 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der manuell und automatisiert erhobenen Rausch-Kenngrößen für alle Mikroskop-Einstellungen.

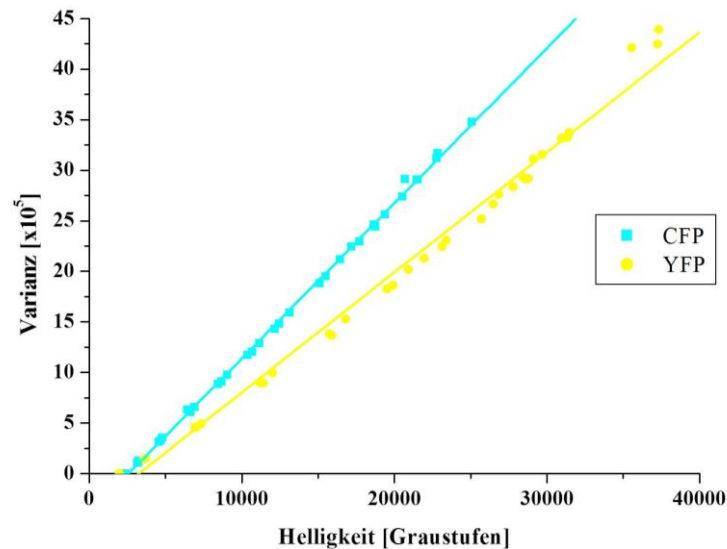


Abbildung 4.10: Signal-Varianzen in Bildern, die an Fluorophor-Lösungen aufgezeichnet wurden. Die Bilder wurden mit *Line Average* 4 und Scan-Geschwindigkeit 100 Hz aufgezeichnet; ihre Varianzen sind aufgetragen gegen die Helligkeit. Die an die Daten angepassten Ausgleichsgeraden sind ebenfalls gezeigt. Daten eines repräsentativen Experiments aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei zufällig gewählten Positionen pro Fluorophor.

Tabelle 4.1: Rausch-Kenngrößen incl. Standardabweichung für verschiedene Mikroskop-Einstellungen. Manuelle Bestimmung der Rausch-Kenngrößen durch Messung von Fluorophor-Lösungen bei den angegebenen Mikroskop-Einstellungen; Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Mikroskop-Einstellungen, Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.					
Kanal	Line Av.	Scan-Geschw. [Hz]	Rausch-Kenngröße		
			A	B	σ_d
CFP	4	100	$158,3 \pm 4,0$	$2370,6 \pm 20,2$	$34,1 \pm 0,4$
	3		$206,6 \pm 3,2$	$2368,7 \pm 18,3$	$39,1 \pm 0,4$
	2		$310,2 \pm 5,8$	$2369,2 \pm 16,2$	$47,7 \pm 0,5$
	1		$611,7 \pm 4,9$	$2365,9 \pm 15,4$	$67,3 \pm 1,7$
		200	$1154,5 \pm 11,8$	$2361,3 \pm 13,8$	$91,5 \pm 3,2$
		400	$2130,6 \pm 37,9$	$2359,0 \pm 14,1$	$129,4 \pm 4,4$
YFP	4	100	$120,8 \pm 3,2$	$1962,2 \pm 31,1$	$15,0 \pm 0,2$
	3		$155,9 \pm 7,3$	$1965,4 \pm 31,6$	$16,7 \pm 0,1$
	2		$229,4 \pm 9,1$	$1963,0 \pm 31,5$	$20,8 \pm 0,1$
	1		$446,4 \pm 12,7$	$1961,6 \pm 27,3$	$29,0 \pm 0,1$
		200	$777,1 \pm 17,5$	$1958,4 \pm 29,0$	$38,8 \pm 1,3$
		400	$1355,7 \pm 20,4$	$1953,2 \pm 29,9$	$55,1 \pm 5,9$

Soweit nicht anders angegeben, wurden im Folgenden die Rausch-Kenngrößen $A_{\text{CFP}} = 158,3$ und $A_{\text{FRET/YFP}} = 120,8$, welche für die Standard-Mikroskop-Einstellungen (*Line Average* 4 und Scan-Geschwindigkeit 100 Hz) ermittelt wurden, verwendet, um das SNR von RhoA-

Biosensor-Bildern vor der ratiometrischen Bildanalyse mit Hilfe des PureDenoise-Makros zu verbessern. Die dazu ebenfalls benötigten Rausch-Kenngrößen B und σ_d wurden für jedes Experiment am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop individuell anhand von Bildern gemessen, die ohne Anregung aufgezeichnet wurden (3.4.3).

4.2.1.2 Effekte von Gauss-Filter und PureDenoise auf die Ergebnisse der Bildanalyse

Am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop wurden Bilder lebender, RhoA-Biosensor-exprimierender MDCK-Zellen aufgezeichnet. Bei den exprimierten Biosensor-Konstrukten handelte es sich um den funktionellen Biosensor (Pertz *et al.*, 2006) sowie eine trunkierte Variante ohne RBD. Für jedes Konstrukt wurden 20 Zellen aufgezeichnet, die mit HGF stimuliert waren, sowie 20 Zellen, die nicht mit HGF stimuliert waren. Die Aufzeichnung erfolgte im Wesentlichen nach Abschnitt 3.4.2, wobei jedoch pro Zelle nur zwei Anregungen mit 458 nm durchgeführt wurden. Auf die direkte Anregung des Akzeptors wurde verzichtet. Somit lagen von jeder Zelle zwei CFP- und zwei FRET-Bilder vor. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Für jede Zelle wurden sieben Bildanalysen (3.5.1.2) durchgeführt, die sich in der Methode der SNR-Verbesserung unterschieden: Für zwei der Analysen wurde zuvor das PureDenoise-Makro mit manueller (4.2.1.1) bzw. automatischer Rausch-Abschätzung auf die Daten angewandt. Die automatische Rausch-Abschätzung ist eine optionale Funktion in PureDenoise, die die Rausch-Kenngrößen ohne Einfluss des Anwenders direkt und individuell aus dem zu bearbeitenden Bild extrapoliert (Luisier *et al.*, 2011). Vier weitere Analysen wurden nach Anwendung der Gauss-Filter-Funktion von ImageJ mit 0,5, 1, 1,5 bzw. 2 Pixel als Radius des Filters durchgeführt. Es wurde auch eine Bildanalyse der unmodifizierten Daten vorgenommen. Alle manuell durchgeführten Schritte der Bildanalyse (Definition einer Hintergrund-Region, Festsetzung des Schwellenwertes zur Erstellung der Maske sowie Definition der Zell-Region zur Erstellung der geklärten Maske) waren dabei für alle sieben Analysen einer Zelle identisch, um anwenderverursachte Variationen auszuschließen. Die Ergebnisse der sieben Bildanalysen werden in den folgenden Abschnitten im Detail verglichen.

4.2.1.2.1 Nicht für jede Rausch-Kenngröße stimmten die automatisch von PureDenoise abgeschätzten und manuell gemessenen Werte gut überein

Der Vergleich zwischen manuell und automatisch gemessenen Rausch-Kenngrößen wurde nur für Bilder durchgeführt, die mit *Line Average* 4 und einer Scan-Geschwindigkeit von 100 Hz aufgezeichnet wurden, da diese Einstellungen der Standard für spätere Biosensor-

Experimente waren. Abbildung 4.11 zeigt den Vergleich der Rausch-Kenngrößen, die automatisch bzw. manuell gemessen wurden; in Tabelle A.9 im Anhang sind die automatisch gemessenen Werte aus Abbildung 4.11 aufgelistet, die manuell gemessenen Werte finden sich in Tabelle 4.1.

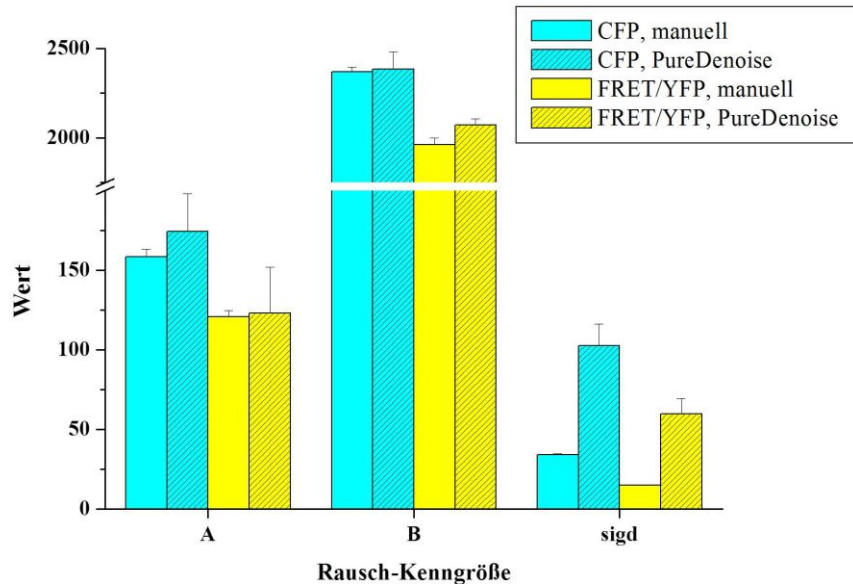


Abbildung 4.11: Vergleich automatisch und manuell gemessener Rausch-Kenngrößen des verwendeten konfokalen Laser-Raster-Mikroskops. Manuell erhobene Daten aus Fluorophor-Lösungen (drei unabhängige Experimente); automatisch erhobene Daten aus Bildern RhoA-Biosensor-exprimierender MDCK-Zellen (pro Kanal insgesamt 320 Bilder aus zwei unabhängigen Experimenten). Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen. Nomenklatur in der Legende: Manuell gemessene FRET/YFP-Rausch-Kenngrößen wurden aus Bildern direkter angeregter YFP-Lösungen gewonnen; automatisch abgeschätzte FRET/YFP-Rausch-Kenngrößen wurden aus FRET-Bildern RhoA-Biosensor-exprimierender Zellen extrahiert. Achsenbeschriftung: „sigd“ entspricht σ_d .

Aus Abbildung 4.11 ist ersichtlich, dass die automatische Abschätzung des Verstärkungsfaktors A durch PureDenoise im Mittel gut mit dem manuell gemessenen Wert übereinstimmt. Jedoch zeigt die hohe Standardabweichung, dass die Abschätzung im Einzelfall dennoch recht ungenau sein kann. Automatische und manuelle Abschätzung der Höhe B des Hintergrundsignals stimmen sehr gut überein. Die Standardabweichung σ_d des Hintergrundsignals wird jedoch von PureDenoise wesentlich höher eingeschätzt, als sie laut der manuellen Messung ist. Daher wurde im Folgenden geprüft, wie sich dieser Unterschied auf die Ergebnisse der Bildanalyse auswirkt.

4.2.1.2.2 Typisches Erscheinungsbild der Quotientenbilder RhoA-Biosensor-exprimierender MDCK-Zellen

Unstimulierte MDCK-Zellen wuchsen in Kolonien mit durchgängigen Zell-Zell-Kontakten. Die Mehrzahl der Zellen an den Kolonierändern bildete keine oder nur sehr kleine Membranausstülpungen aus. Nach Zugabe von HGF (3.3.2.2) bildeten die Zellen innerhalb von 20 min großflächige, dynamische Membranausstülpungen aus (nicht gezeigt). Fast alle Zellen an den Kolonierändern zeigten diese Reaktion und bildeten die Ausstülpungen an ihrer freiliegenden Kante. Es reagierten jedoch auch viele Zellen, die im Inneren der Kolonie lagen und lateral vollständig von benachbarten Zellen umschlossen waren (nicht gezeigt). Diese schoben Membranausstülpungen über oder unter Nachbarzellen.

Abbildung 4.12 zeigt das typische Erscheinungsbild einer RhoA-Biosensor-exprimierenden MDCK-Zelle unter HGF-Einfluss. Für alle sieben Auswertungsmethoden (links neben den Bildern angegeben) sind jeweils ein CFP-Bild (linke Spalte), ein FRET/CFP-Quotientenbild (mittlere Spalte) und ein CFP2/CFP-Quotientenbild (rechte Spalte) gezeigt. Das FRET/CFP-Quotientenbild wird als Maß für die Verteilung der RhoA-Aktivität in der Zelle betrachtet, während das CFP2/CFP-Quotientenbild keine biologische Information enthält, sondern zur Qualitäts-Bewertung der Bilddaten dient: Für Daten mit hohem SNR zeigt das zugehörige CFP2/CFP-Bild ein homogenes Erscheinungsbild und ein schmales Histogramm.

In Abbildung 4.12 ist die Membranausstülpung der Zelle in den CFP-Bildern zu erkennen. Die FRET/CFP-Quotientenbilder zeigen erhöhtes Signal in dieser Region. Die Helligkeitsverteilung in den CFP2/CFP-Quotientenbildern ist dagegen nahezu homogen, was darauf hindeutet, dass die Zelle keine Regionen besonders geringen SNRs enthält. Im CFP-Bild ohne SNR-Verbesserung ist die recht hohe Standardabweichung des Signals zu erkennen. Diese setzt sich in den zugehörigen FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern fort. Der Kontrast zwischen dunklen und hellen Flächen im FRET/CFP-Quotientenbild tritt nach der individuellen Helligkeits-Skalierung vergleichsweise schwach hervor. Die CFP-Bilder, deren SNR verbessert wurde, zeigen ein wesentlich geringeres Rauschen. Die Kontraste in den jeweils resultierenden FRET/CFP-Quotientenbildern sind deutlicher erkennbar, obwohl die Helligkeits-Skalierung nach denselben formalen Vorgaben erfolgte (3.5.1.2). Die Signalverteilung in den CFP2/CFP-Quotientenbildern bleibt trotz vorheriger SNR-Verbesserung weitgehend homogen, sie wirken jedoch „körnig“. Die SNR-Verbesserung mit dem PureDenoise-Makro führt für automatische und manuelle Rausch-Abschätzung zu untereinander nahezu identischen Ergebnissen. Diese sind am ehesten mit denen vergleichbar, die nach einem Gauss-Filter mit einem Radius von 1 Pixel erzielt wurden.

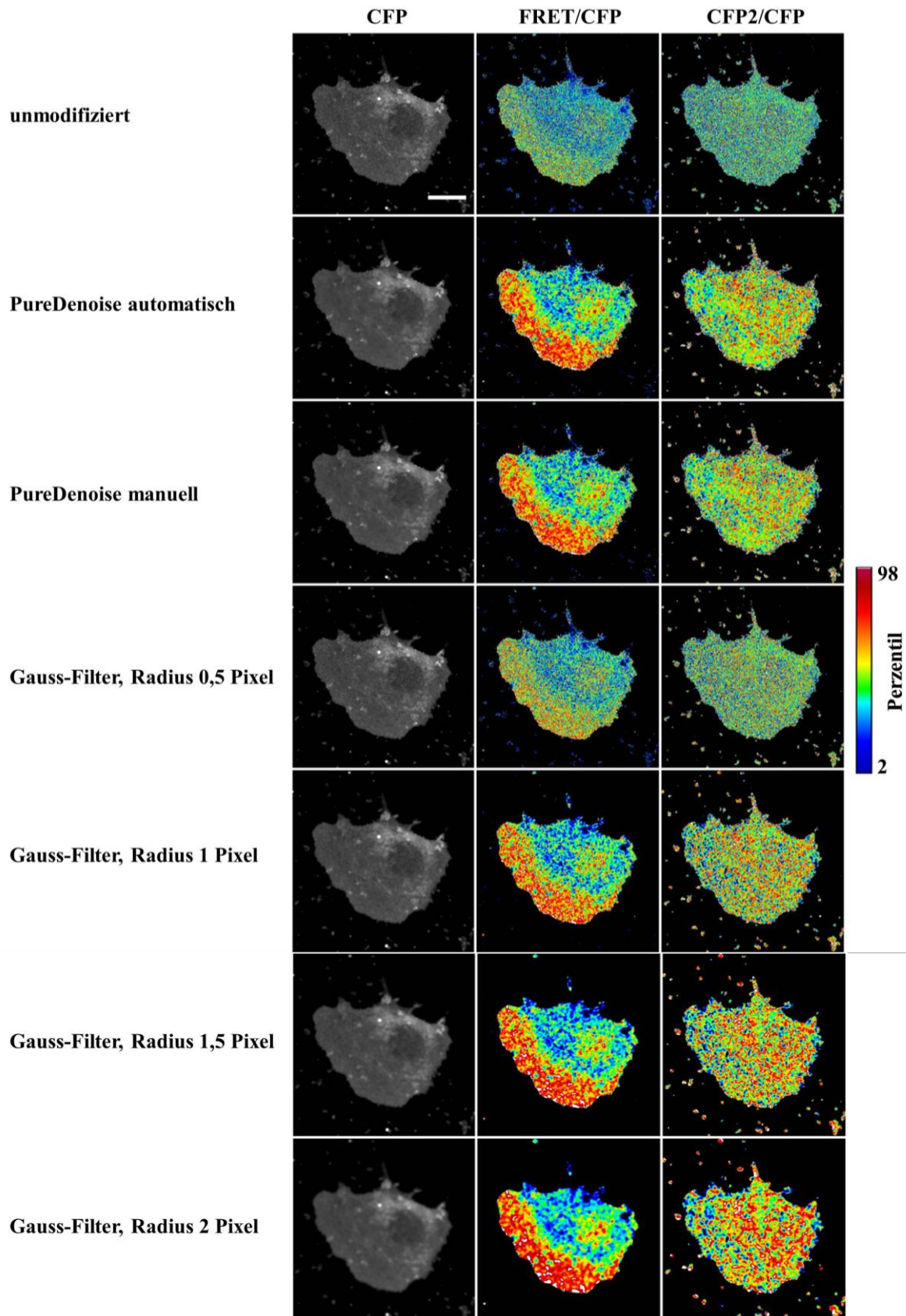


Abbildung 4.12: Repräsentative RhoA-Biosensor-exprimierende MDCK-Zelle nach HGF-Behandlung. Bilder vom konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. Auf einen einzigen Satz von Bildern wurden verschiedene SNR-Verbesserungen angewandt und dann jeweils die Bildanalyse durchgeführt. Jede Zeile zeigt für eine SNR-Verbesserung ein CFP-Bild (links), das FRET/CFP-Quotientenbild (RhoA-Aktivität; Mitte) und das CFP2/CFP-Quotientenbild (SNR-Kontrolle; rechts). Die angewandte Methode der SNR-Verbesserung ist jeweils links von den Bildern angegeben. Die Helligkeit jedes Quotientenbildes ist individuell skaliert. Maßstabsbalken entspricht 15 μm .

Der Gauss-Filter mit einem geringeren Radius von 0,5 Pixeln hat einen sichtlich schwächeren Glättungseffekt, so dass die resultierenden Quotientenbilder am ehesten mit denen aus unmodifizierten Daten zu vergleichen sind. Die höheren Radien von 1,5 und 2 Pixeln für den Gauss-Filter sorgen für eine stärkere Glättung. Die zugehörigen CFP-Bilder wirken jedoch unscharf und in den resultierenden CFP2/CFP-Quotientenbildern ist das „körnige“ Erscheinungsbild verstärkt: Immer größere helle und dunkle Flächen sind immer klarer voneinander abgegrenzt, obwohl die Helligkeit dieser Bilder nach wie vor nahezu unabhängig von der Zellregion zu sein scheint.

Abbildung 4.13 zeigt exemplarische Zellen aus allen vier Populationen des Experiments (exprimierte Konstrukte: funktionaler sowie RBD-trunkierter RhoA-Biosensor; mit sowie ohne HGF). Für jede Zelle sind jeweils ein CFP-Bild (links), das FRET/CFP-Quotientenbild (Mitte) sowie das CFP2/CFP-Quotientenbild (rechts) gezeigt. Die Rohdaten wurden vor der Bildanalyse mit dem PureDenoise-Makro mit manueller Rausch-Abschätzung geglättet.

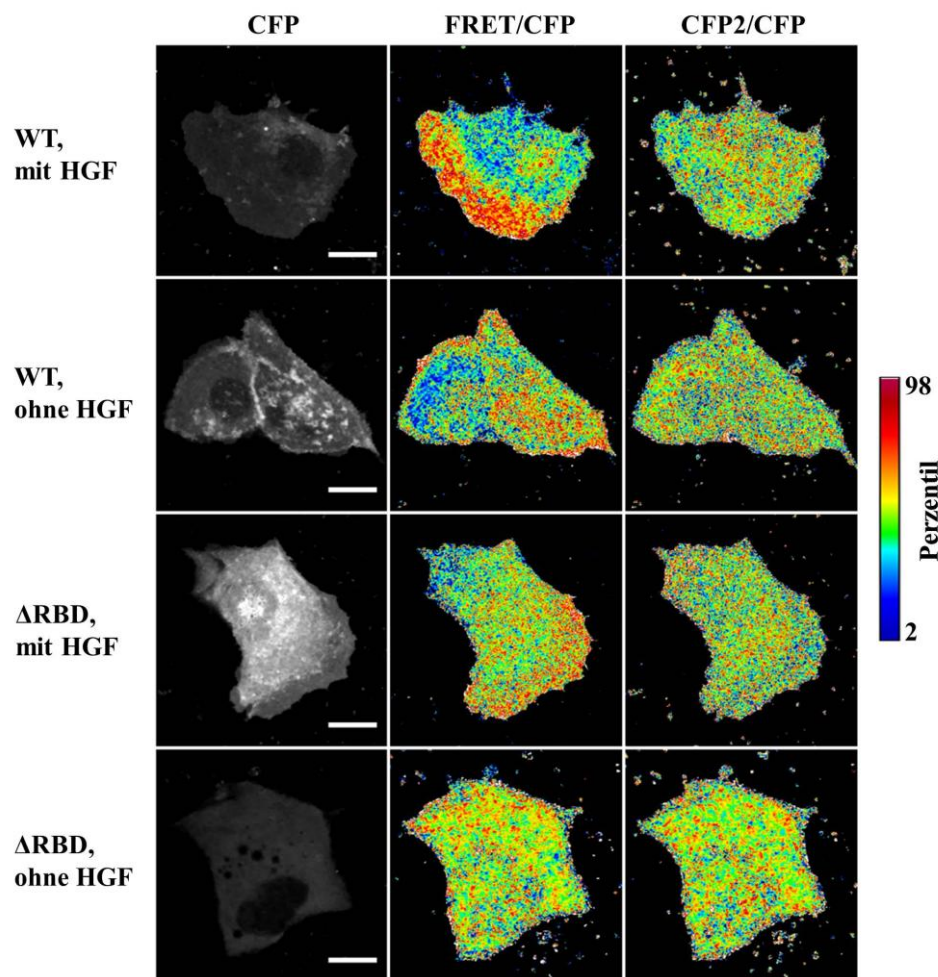


Abbildung 4.13: Repräsentative Zellen für jede der vier Populationen in dem Experiment. Das SNR aller Bilder wurde vor der Bildanalyse mit dem PureDenoise-Makro mit manueller Rausch-Abschätzung verbessert. Für jede Zelle sind in einer Zeile ein CFP-Bild (links), das FRET/CFP-Quotientenbild (Mitte) und das CFP2/CFP-Quotientenbild (rechts) gezeigt. Jeweils links von den Bildern sind das exprimierte Konstrukt sowie eventuelle Behandlung mit HGF angegeben. Die Helligkeit jedes Quotientenbildes ist individuell skaliert. Maßstabsbalken entsprechen je 15 μm .

Beide HGF-behandelten Zellen in Abbildung 4.13 haben die typische Membranausstülpung ausgebildet. Jedoch zeigt nur das FRET/CFP-Quotientenbild aus der Zelle, die den funktionalen RhoA-Biosensor exprimiert, die typische deutliche Signalerhöhung in diesem Bereich. Bei der Zelle, die den RBD-trunkierten RhoA-Biosensor exprimiert, ist der entsprechende Helligkeitsunterschied nur sehr schwach erkennbar. Das entspricht der Erwartung, da dieses Konstrukt seine Konformation nicht in Abhängigkeit vom RhoA-Aktivitätszustand ändern sollte. Ebenfalls erwartungsgemäß zeigen die Zellen ohne HGF nahezu keine Membranausstülpungen, ihre FRET/CFP-Quotientenbilder haben dementsprechend keine Bereiche deutlich erhöhter Helligkeit. Die CFP2/CFP-Quotientenbilder sind für alle vier Zellen gleichermaßen homogen.

Einige wenige MDCK-Zellen bildeten auch in Abwesenheit von HGF große, dynamische Membranausstülpungen aus. Es wurde nicht näher untersucht, welcher Einfluss diese „spontanen“ Ausstülpungen hervorrief. FRET/CFP-Quotientenbilder von MDCK-Zellen, die den funktionalen RhoA-Biosensor exprimierten, zeigten jedoch immer erhöhtes Signal in den Bereichen großer Membranausstülpungen. Dies war unabhängig davon, ob die Ausstülpungen durch HGF oder in Abwesenheit von HGF durch einen unbekannten Stimulus verursacht waren (nicht gezeigt).

4.2.1.2.3 Moderate SNR-Verbesserung beeinflusste zwar kaum die Helligkeit der Rohdaten, aber dennoch die der Quotientenbilder

Die mittlere Helligkeit von Bildern sollte durch SNR-Verbesserung unbeeinflusst bleiben. Die mittlere Helligkeit der nach SNR-Verbesserung errechneten Quotientenbilder dagegen sollte geringer sein als die von Quotientenbildern aus unmodifizierten Daten, da das Rauschen des Nennerbildes eine Helligkeitsdrift des Quotientenbildes zu höheren Werten verursacht (Wang, 2007; zur Veranschaulichung s. Abbildung A.1 im Anhang). Es sollte daher gemessen werden, inwiefern die in dieser Arbeit getesteten SNR-Verbesserungen die Helligkeit der Rohdaten und der resultierenden Quotientenbilder beeinflussten.

Für Abbildung 4.14 wurden die Daten aller 160 Zellen aus den beiden unabhängigen Experimenten vereint. Die Abbildung zeigt die normalisierte mittlere Helligkeit der CFP-Bilder dieser Zellen, sowie die normalisierten mittleren Helligkeiten ihrer FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbilder. Die Werte sind für die unmodifizierten Daten sowie für die sechs verschiedenen SNR-Verbesserungen angegeben. Als Referenz für die Normalisierung eines Bildes wurde stets das entsprechende Bild derselben Zelle ohne vorherige SNR-

Verbesserung verwendet. Aus den so normalisierten Werten wurden die dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet. Diese Reihenfolge der statistischen Auswertung trägt dem Umstand Rechnung, dass derselbe Datensatz siebenmal unter verschiedenen Bedingungen ausgewertet wurde. Die Standardabweichung innerhalb dieses Datensatzes ist daher unerheblich für die Frage, wie sich die unterschiedlichen Bedingungen auf die Auswertungsergebnisse auswirken. Die in Abbildung 4.14 aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.10 im Anhang aufgelistet.

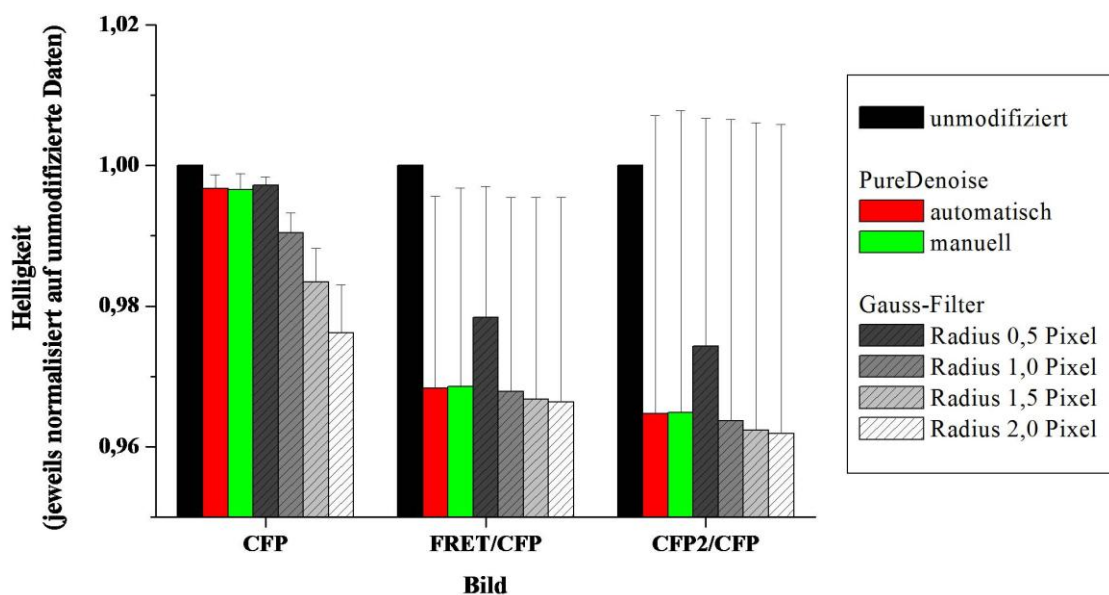


Abbildung 4.14: Helligkeiten von CFP-Bildern sowie FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern in Abhängigkeit von der verwendeten SNR-Verbesserung. Werte aus 160 Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten. Alle Helligkeiten wurden zunächst auf die entsprechende Helligkeit derselben Zelle ohne vorherige SNR-Verbesserung normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte dieser normalisierten Helligkeiten sowie deren Standardabweichungen.

Das PureDenoise-Makro und der Gauss-Filter mit Radius 0,5 Pixel verringerten die Helligkeit der CFP-Bilder um weniger als 0,5% (Abbildung 4.14). Je höher der für den Gauss-Filter gewählte Radius war, umso stärker wurde die Helligkeit der CFP-Bilder dadurch verringert. Ein Radius von 2 Pixeln verringerte die Helligkeit der CFP-Bilder durchschnittlich bereits um nahezu 2,5%. Die Helligkeit von FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern wurde von allen verwendeten Methoden zur SNR-Verbesserung verringert. Am schwächsten wirkte hier der Gauss-Filter mit einem Radius von 0,5 Pixeln. Die Wirkungen aller anderen Methoden auf diese Bilder waren untereinander vergleichbar. Durch Erhöhung des Gauss-Filter-Radius lassen sich auch hier tendenziell die Helligkeiten weiter verringern, jedoch ist dieser Effekt gering im Vergleich zu dem unerwünschten Effekt auf die Helligkeit der CFP-Bilder.

4.2.1.2.4 Die Histogrammbreite eines Quotientenbildes war von der Helligkeit der Rohdaten abhängig; SNR-Verbesserung verringerte diese Abhängigkeit

In Abschnitt 4.2.1.2.2 wurden die Kontraste in RhoA-Biosensor-Quotientenbildern qualitativ beurteilt. Erwartungsgemäß müsste ein kontraststarkes Quotientenbild ein breiteres Histogramm haben als ein kontrastarmes. Rauschen verbreitert das Histogramm eines Quotientenbildes jedoch ebenfalls (Wang, 2007; zur Veranschaulichung s. Abbildung A.1 im Anhang). Daher wurde untersucht, ob der individuelle Skalierungsfaktor, der ein Maß für die Histogrammbreite eines Quotientenbildes ist, auch als Maß für dessen Kontraststärke genutzt werden kann und wie sich die verschiedenen Methoden der SNR-Verbesserung darauf auswirken.

Abbildung 4.15 zeigt die individuellen Skalierungsfaktoren der FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbilder von MDCK-Zellen, die den funktionellen RhoA-Biosensor exprimieren und mit HGF stimuliert sind. Es handelt sich also mehrheitlich um Zellen mit großen, dynamischen Membranausstülpungen, deren FRET/CFP-Quotientenbilder durch verstärktes Signal in diesen Regionen kontrastreich sind, während die CFP2/CFP-Quotientenbilder kontrastarm sind. Die Quotientenbilder wurden ohne vorherige SNR-Verbesserung der Rohdaten berechnet. Die Skalierungsfaktoren sind in Abhängigkeit von der Helligkeit der CFP-Bilder aufgetragen. Sie entstammen zwei unabhängigen Experimenten.

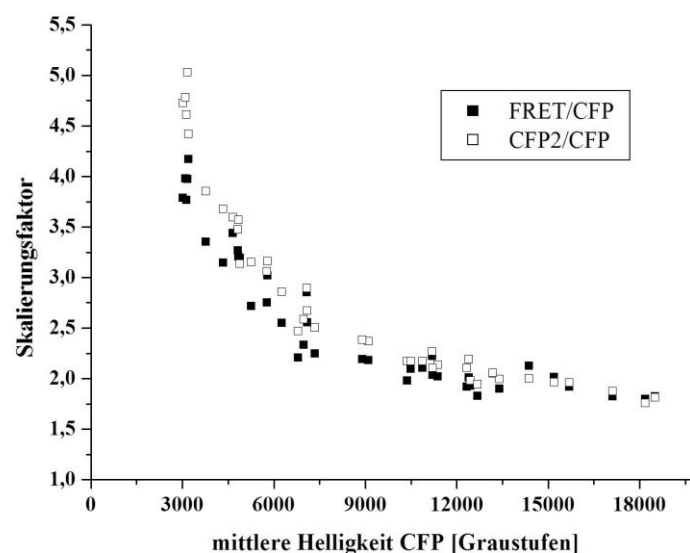


Abbildung 4.15: Individuelle Skalierungsfaktoren von FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern. Die Skalierungsfaktoren sind gegen die Rohdaten-Helligkeit aufgetragen. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten an insgesamt 40 RhoA-Biosensor-exprimierenden MDCK-Zellen, die mit HGF stimuliert wurden.

Aus Abbildung 4.15 werden zwei Dinge ersichtlich: Erstens ist die Größe des Skalierungsfaktors abhängig von der Helligkeit der Rohdaten: Je heller das CFP-Bild, umso geringer sind die Skalierungsfaktoren der resultierenden Quotientenbilder. Es scheint jedoch einen unteren Schwellenwert für die Größe der Skalierungsfaktoren zu geben. Zweitens sind die Skalierungsfaktoren der kontrastarmen CFP2/CFP-Quotientenbilder nicht wie erwartet kleiner als die der kontraststärkeren FRET/CFP-Quotientenbilder, sondern sogar größer als diese. Beide Effekte treten auch mit Daten unstimulierter Zellen auf, sowie mit Daten von MDCK-Zellen, welche den RBD-trunkierten RhoA-Biosensor exprimieren (nicht gezeigt).

Abbildung 4.16 zeigt den Einfluss der verschiedenen SNR-Verbesserungen auf die Skalierungsfaktoren der resultierenden Quotientenbilder. Die Daten entstammen denselben Bildern wie in Abbildung 4.15 und sind wieder gegen die Helligkeit der Rohdaten aufgetragen. Hier sind nur die FRET/CFP-Skalierungsfaktoren gezeigt, jedoch für jede der verwendeten SNR-Verbesserungs-Methoden.

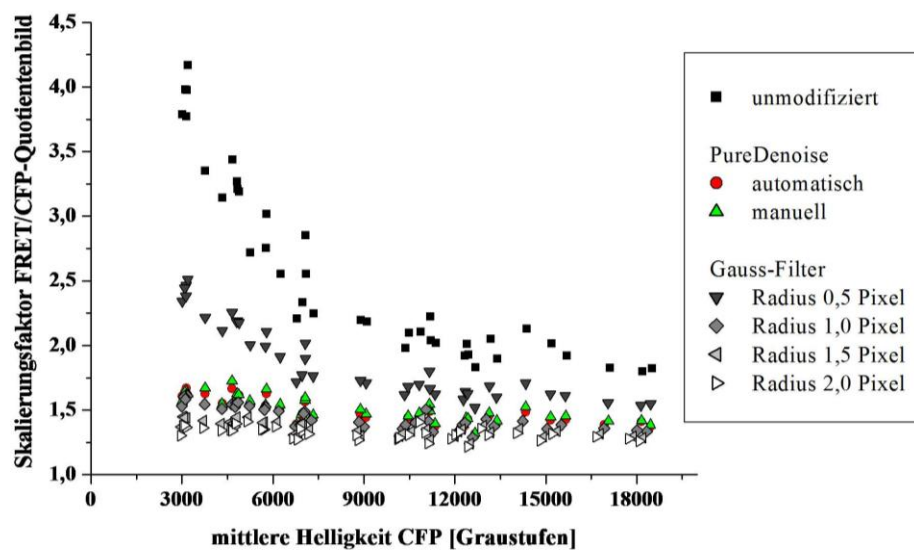


Abbildung 4.16: Einfluss unterschiedlicher Methoden der SNR-Verbesserung auf FRET/CFP-Skalierungsfaktoren. Die Skalierungsfaktoren sind gegen die Rohdaten-Helligkeit aufgetragen. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten an insgesamt 40 RhoA-Biosensor-exprimierenden MDCK-Zellen, die mit HGF stimuliert wurden.

Die Skalierungsfaktoren der FRET/CFP-Quotientenbilder verringerten sich durch vorherige SNR-Verbesserung (Abbildung 4.16). Ihre Abhängigkeit von der Helligkeit der Rohdaten nahm ebenfalls ab. Die verschiedenen Radien des Gauss-Filters zeigen, dass beide Effekte umso deutlicher waren, je stärker die Daten geglättet werden. Der Effekt des PureDenoise-Makros war weitgehend unabhängig davon, ob das Rauschen automatisch oder manuell

abgeschätzt wurde: Die resultierenden Skalierungsfaktoren waren sehr ähnlich. Der Effekt, den das PureDenoise-Makro auf die Skalierungsfaktoren hatte, war nur wenig schwächer als der des Gauss-Filters mit Radius 1 Pixel. Auch diese Effekte traten ebenso bei Daten unstimulierter Zellen auf, sowie bei Daten von MDCK-Zellen, welche den RBD-trunkierten RhoA-Biosensor exprimieren (nicht gezeigt).

Abbildung 4.17 vergleicht die individuellen Skalierungsfaktoren von FRET/CFP- und zugehörigen CFP2/CFP-Quotientenbildern derselben MDCK-Zellen wie die Abbildungen 4.15 und 4.16. Die Skalierungsfaktoren sind wieder gegen die Helligkeit der CFP-Bilder aufgetragen. Jedoch wurde hier vor Berechnung der Quotientenbilder das SNR der Rohdaten mit dem PureDenoise-Makro mit manueller Rausch-Abschätzung verbessert.

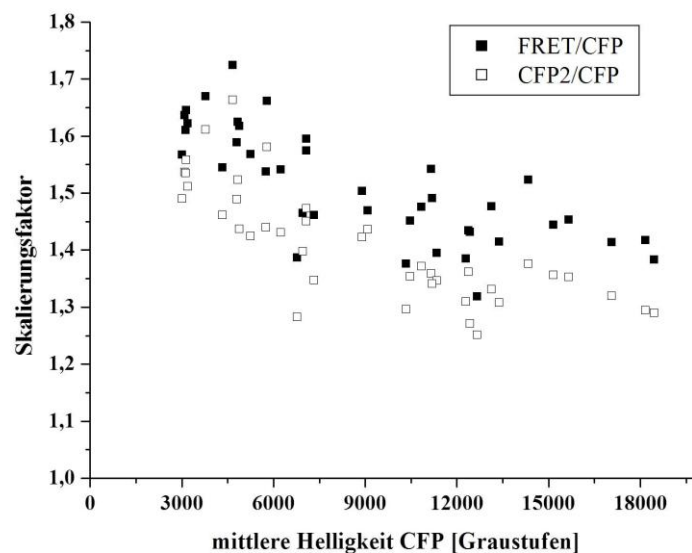


Abbildung 4.17: Individuelle Skalierungsfaktoren von FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern. Die Skalierungsfaktoren sind gegen die Rohdaten-Helligkeit aufgetragen. Daten aus zwei unabhängigen Experimenten an RhoA-Biosensor-exprimierenden MDCK-Zellen, die mit HGF stimuliert wurden. Das SNR der Rohdaten wurde vor Berechnung der Quotientenbilder mit dem PureDenoise-Makro mit manueller Rausch-Abschätzung verbessert.

In Abbildung 4.17 sind die Skalierungsfaktoren der FRET/CFP-Quotientenbilder deutlich höher als die der zugehörigen CFP2/CFP-Quotientenbilder. Aus dieser Auftragung wird jedoch auch ersichtlich, dass die Skalierungsfaktoren nach wie vor merklich von der Helligkeit der Rohdaten abhängig sind: CFP2/CFP-Skalierungsfaktoren aus dunklen Rohdaten sind nach wie vor größer als FRET/CFP-Skalierungsfaktoren aus hellen Rohdaten. Auch bei Quotientenbildern, die aus SNR-verbesserten Rohdaten berechnet wurden, weisen Quotientenbilder mit stärkeren Kontrasten (wie die FRET/CFP-Quotientenbilder) nicht

automatisch auch größere Skalierungsfaktoren auf als Quotientenbilder mit schwachen Kontrasten (wie CFP2/CFP-Quotientenbilder).

Es sollte geprüft werden, ob SNR-Verbesserung der Rohdaten eine bessere Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen erlaubt, obwohl die Abhängigkeit der Skalierungsfaktoren von der Helligkeit der Rohdaten nicht vollständig eliminiert werden konnte. Für Abbildung 4.18 wurden dazu die Skalierungsfaktoren normalisiert: Dazu wurde jeder FRET/CFP-Skalierungsfaktor durch den zugehörigen CFP2/CFP-Skalierungsfaktor aus derselben Analyse geteilt. Das wurde für die Zellen aller vier Populationen (Expression von funktionellem RhoA-Biosensor bzw. RBD-trunkiertem RhoA-Biosensor als Negativkontrolle, mit bzw. ohne HGF) aus beiden unabhängigen Experimenten und für alle angewendeten Methoden der SNR-Verbesserung durchgeführt. Die in Abbildung 4.18 aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.11 im Anhang aufgelistet.

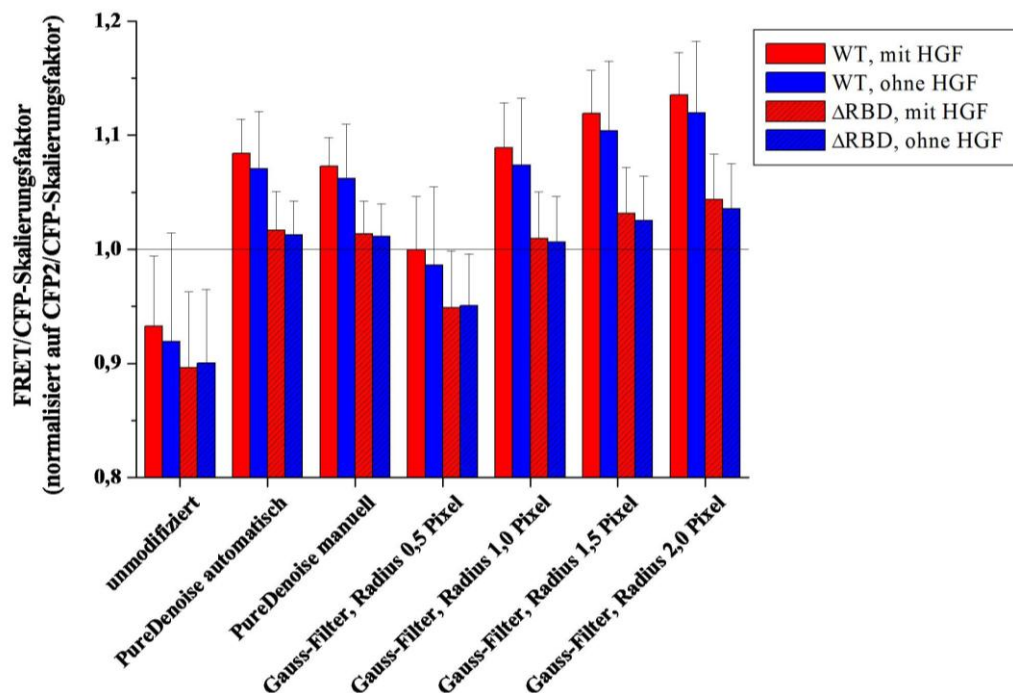


Abbildung 4.18: Normalisierte Skalierungsfaktoren der Quotientenbilder von MDCK-Zellen, die RhoA-Biosensor-Konstrukte unter verschiedenen Bedingungen exprimieren. Die Zellen exprimierten den funktionellen oder den RBD-trunkierten RhoA-Biosensor in Gegenwart oder Abwesenheit von HGF. Die Skalierungsfaktoren ihrer FRET/CFP-Quotientenbilder wurden auf die Skalierungsfaktoren der entsprechenden CFP2/CFP-Quotientenbilder normalisiert. Die Werte wurden für unmodifizierte Daten sowie für die sechs in dieser Arbeit angewandten Varianten der SNR-Verbesserung erhoben. Jeder Balken zeigt Mittelwert und Standardabweichung von 40 Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Aus Abbildung 4.18 ist ersichtlich, welche SNR-Verbesserung dazu führte, dass die FRET/CFP- Skalierungsfaktoren die CFP2/CFP-Skalierungsfaktoren merklich überstiegen

und inwieweit sich die sonstigen experimentellen Bedingungen (exprimiertes Biosensor-Konstrukt, Zugabe oder Fehlen von HGF) anhand dieser Kenngröße unterscheiden ließen. Wurde das SNR der Daten vor der Analyse nicht verbessert, so waren die FRET/CFP-Skalierungsfaktoren stets kleiner als die CFP2/CFP-Skalierungsfaktoren (vgl. Abb. 4.15). Der Gauss-Filter mit Radius 0,5 Pixel verringerte diese Differenz; für den funktionellen RhoA-Biosensor waren die FRET/CFP- und CFP2/CFP-Skalierungsfaktoren dann ungefähr gleich groß. Nach SNR-Verbesserung mit PureDenoise oder Gauss-Filtern mit Radius 1 Pixel oder größer waren die FRET/CFP-Skalierungsfaktoren des funktionellen RhoA-Biosensors dann merklich größer als die zugehörigen CFP2/CFP-Skalierungsfaktoren. Für die kontrastschwachen FRET/CFP-Quotientenbilder des RBD-trunkierten RhoA-Biosensors galt dies nicht: Hier stiegen die FRET/CFP-Skalierungsfaktoren erst für starke Gauss-Filter mit Radien von 1,5 oder 2 Pixeln merklich über die CFP2/CFP-Skalierungsfaktoren an. Skalierungsfaktoren der Quotientenbilder von funktionellem und RBD-trunkiertem RhoA-Biosensor verhielten sich also unterschiedlich. Dieser Unterschied war bereits für unmodifizierte Daten statistisch signifikant, dort allerdings nur für HGF-behandelte Zellen. Für den Gauss-Filter mit Radius 0,5 Pixel war der Unterschied bereits sowohl für HGF-behandelte als auch für unbehandelte Zellen signifikant, die Signifikanzen waren für alle stärkeren SNR-Verbesserungen jedoch noch wesentlich höher. Die Betrachtung der normalisierten Skalierungsfaktoren erlaubte jedoch keine Unterscheidung HGF-stimulierter und unstimulierter Zellen: Die Werte für HGF-behandelte Zellen schienen in fast allen Fällen leicht über den Werten unbehandelter Zellen zu liegen, jedoch war dieser Unterschied in keinem Fall signifikant. Die Populationen scheinen in sich zu heterogen zu sein, um eine signifikante Unterscheidung zu erlauben. Mit größeren Populationen könnte sich jedoch der subjektive Eindruck bestätigen lassen, dass die FRET/CFP-Quotientenbilder RhoA-Biosensor-exprimierender MDCK-Zellen durch HGF-Stimulation kontrastreicher werden.

4.2.1.2.5 Detaillierter Vergleich der SNR-Verbesserung mit PureDenoise und Gauss-Filter mit Radius 1 Pixel: Die resultierenden Quotientenbilder unterschieden sich hauptsächlich an den Zellrändern

Da der Gauss-Filter mit Radius 1 Pixel Ergebnisse erbracht hatte, die denen des PureDenoise-Makros sehr ähnlich waren (Abschnitt 4.2.1.2.4), sollte das Erscheinungsbild der resultierenden FRET/CFP-Quotientenbilder detailliert verglichen werden. Abbildung 4.19 zeigt exemplarisch den Vergleich der FRET/CFP-Quotientenbilder einer HGF-stimulierten MDCK-Zelle, die den funktionellen RhoA-Biosensor exprimiert: Vor Berechnung der

Quotientenbilder wurden die Rohdaten mit dem PureDenoise-Makro mit manueller bzw. automatischer Rausch-Abschätzung (links bzw. mittig oben) bzw. mit einem Gauss-Filter mit Radius 1 Pixel (rechts oben) geglättet. Die unteren Bilder verdeutlichen, in welchen Regionen sich die drei oberen Quotientenbilder hauptsächlich unterscheiden. Zur Erstellung des Bildes links unten wurde dazu das Quotientenbild nach automatischem PureDenoise durch das Quotientenbild nach manuellem PureDenoise geteilt; zur Erstellung des Bildes rechts unten wurde das Quotientenbild nach Gauss-Filter mit Radius 1 Pixel durch das Quotientenbild nach manuellem PureDenoise geteilt. Alle Quotientenbilder wurden individuell skaliert (3.5.1.2). Die Skalierungsfaktoren sind als Maß für die jeweilige Histogramm-Breite angegeben. Je größer der Skalierungsfaktor eines solchen „Quotienten-Quotientenbildes“ ist, umso größer sind auch die Unterschiede zwischen den beiden Quotientenbildern, aus denen es berechnet wurde.

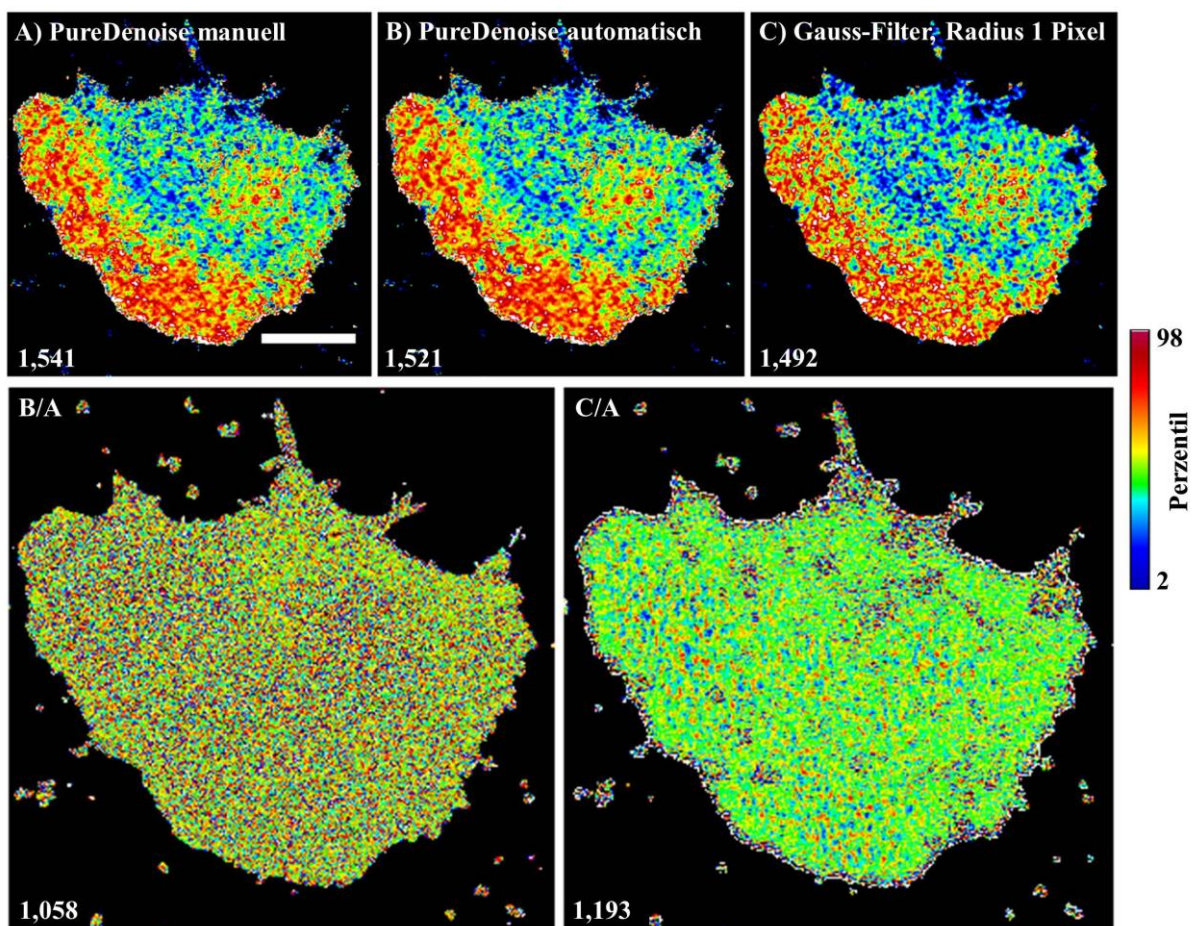


Abbildung 4.19: Vergleich von FRET/CFP-Quotientenbildern, die nach verschiedenen Methoden der SNR-Verbesserung berechnet wurden. HGF-stimulierte, RhoA-Biosensor-exprimierende MDCK-Zelle. Oben: FRET/CFP-Quotientenbilder (zugehörige SNR-Verbesserungen: A) PureDenoise mit manueller Rausch-Abschätzung; B) PureDenoise mit automatischer Rausch-Abschätzung; C) Gauss-Filter mit Radius 1 Pixel). Unten: Quotienten der oberen Bilder (links: Bild oben Mitte geteilt durch Bild oben links; rechts: Bild oben rechts geteilt durch Bild oben links). Die Helligkeit aller Quotientenbilder ist individuell skaliert, Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Maßstabsbalken entspricht 15 μm .

Die starke Homogenität des Bildes links unten in Abbildung 4.19 und sein niedriger Skalierungsfaktor verdeutlichen, wie groß die schon mit bloßem Auge sichtbare Übereinstimmung zwischen Quotientenbildern war, die nach SNR-Verbesserung mit PureDenoise mit manueller bzw. automatischer Rausch-Abschätzung berechnet wurden. Das Bild rechts unten hat einen höheren Skalierungsfaktor und ist außerdem weniger homogen. Besonders an den Zellrändern und in Regionen, in denen in den Rohdaten starke Kontraste auftraten (vgl. Abb. 4.12), unterschieden sich die Quotientenbilder, die nach SNR-Verbesserung mit manuellem PureDenoise und Gauss-Filter mit Radius 1 Pixel berechnet wurden.

4.2.2 Mechanistische Untersuchungen am RhoA-Biosensor

Die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Experimente sollten klären, ob das FRET/CFP-Quotientensignal des RhoA-Biosensors wie postuliert ausschließlich durch den Nukleotid-Beladungszustand des Biosensor-RhoAs bestimmt wird. Die Hauptmenge an Bilddaten für die mechanistischen Untersuchungen des RhoA-Biosensors wurde am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop gesammelt (Abschnitt 3.4.2) und ratiometrisch ausgewertet (Abschnitt 3.5.1.2). Vor der Auswertung solcher Daten wurde ihr SNR mit dem PureDenoise-Makro mit manueller Rausch-Abschätzung (Abschnitt 4.2.1.1) verbessert. In dieser Arbeit wurden 23 verschiedene RhoA-Biosensor-Varianten auf ihre Unterschiede hin untersucht. Betrachtet wurde ihre Lokalisation in lebenden Zellen, eventuelle morphologische Veränderungen, die sie in den exprimierenden Zellen auslösten, sowie die Helligkeit und Signalverteilung ihrer Quotientenbilder (hauptsächlich die der FRET/CFP-Quotientenbilder). Diese Eigenschaften sind zur Übersicht auch für alle Konstrukte gesammelt in Tabelle A.1 im Anhang aufgelistet.

4.2.2.1 Die mittlere Helligkeit von FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors variierte stark zwischen einzelnen Zellen

Es ist zu erwarten, dass die FRET/CFP-Quotientenbilder des RhoA-Biosensors heller sind, wenn sein RhoA-Teil konstitutiv aktiv ist. Es sollte überprüft werden, ob diese Erwartung auch von Einzelzellen und kleinen Populationen zuverlässig erfüllt wird. Am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop wurden dazu Bilder lebender, HGF-stimulierter MDCK-Zellen aufgezeichnet, welche entweder den funktionellen RhoA-Biosensor (WT) exprimierten, oder eine Variante des Biosensors, in der das RhoA durch die Mutation Q63L konstitutiv aktiv ist (Q63L). In jedem berechneten FRET/CFP-Quotientenbild wurde die mittlere Helligkeit der

Zelle gemessen. Abbildung 4.20 A zeigt für sechs unabhängige Experimente jeweils die Mittelwerte dieser Helligkeiten sowie deren Standardabweichung. Die in Abbildung 4.20 A aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.12 im Anhang aufgelistet. Abbildung 4.20 B zeigt für ein einzelnes Experiment (Experiment 1 aus Abbildung 4.20 A) die mittleren Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder der individuellen Zellen, jeweils aufgetragen gegen die Helligkeit des zugehörigen CFP-Bildes.

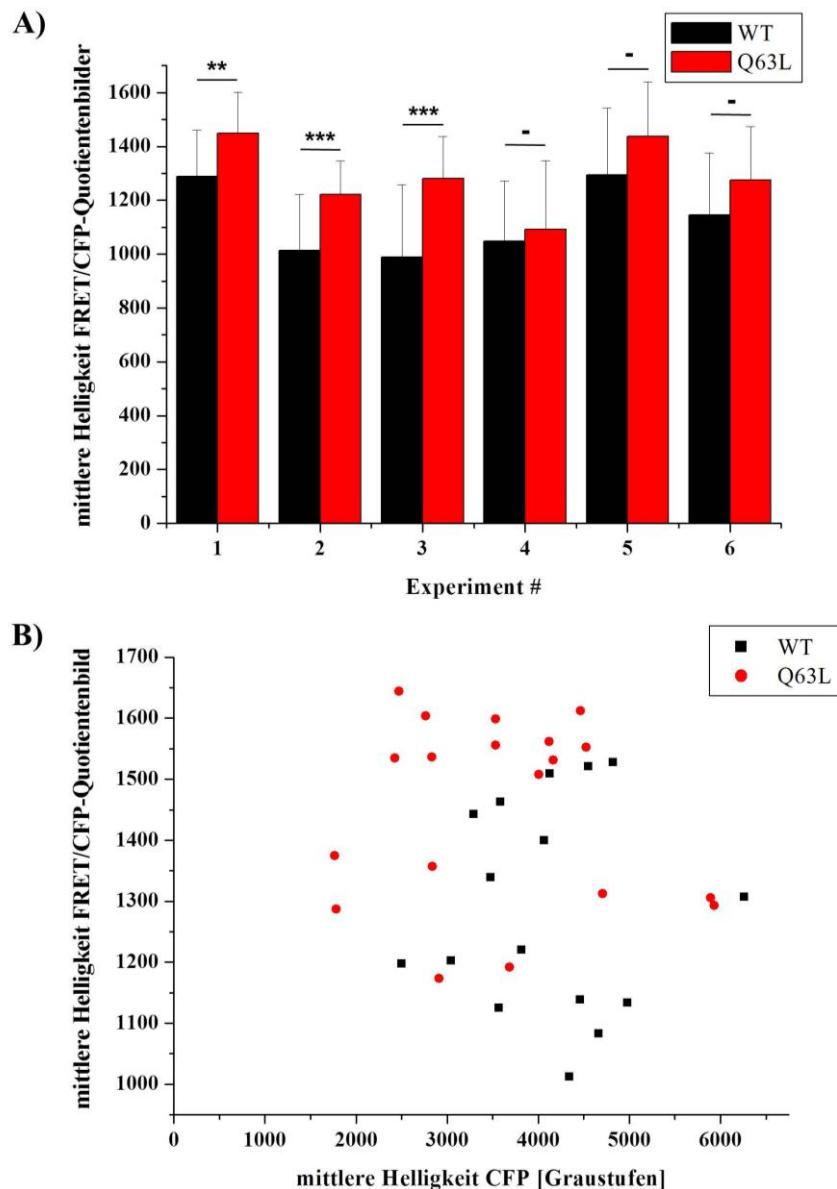


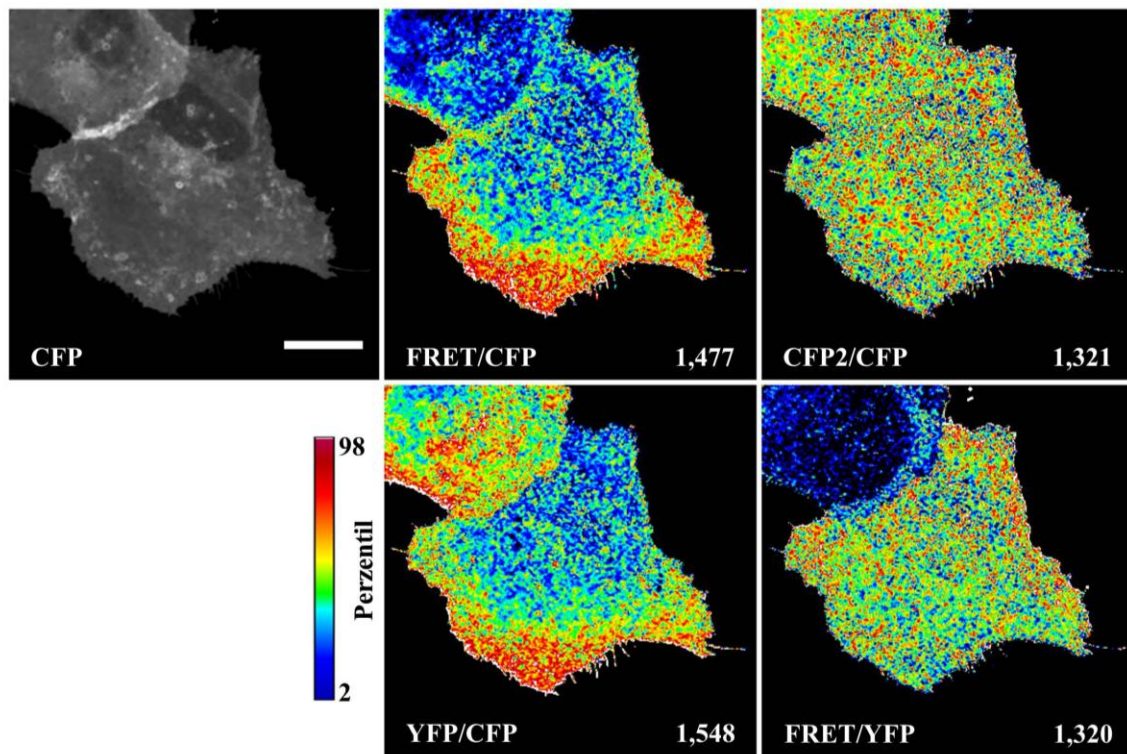
Abbildung 4.20: Mittlere Helligkeiten von FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors. FRET/CFP-Quotientenbilder lebender MDCK-Zellen, die den funktionellen RhoA-Biosensor (WT) oder einen Biosensor mit konstitutiv aktivem RhoA (Q63L) exprimierten. A) Mittelwert und Standardabweichung für jede Population; Ergebnisse aus sechs unabhängigen Experimenten sind nebeneinander dargestellt; 16-20 Zellen pro Experiment und Population. p-Werte: „-“ $> 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$. B) Individuelle mittlere FRET/CFP-Helligkeiten, aufgetragen gegen die mittlere Helligkeit der zugehörigen CFP-Bilder; Daten entstammen Experiment Nr.1 aus A).

Aus Abbildung 4.20 A wird ersichtlich, dass die FRET/CFP-Quotientenbilder des konstitutiv aktiven RhoA-Biosensors im Mittel erwartungsgemäß heller waren als die des funktionellen RhoA-Biosensors. Durch die hohe Standardabweichung war dieser Unterschied jedoch nicht in jedem Experiment signifikant. In Abbildung 4.20 B ist kein Zusammenhang zwischen der Helligkeit des CFP-Bildes und der des resultierenden FRET/CFP-Quotientenbildes erkennbar. In jenem Experiment wurden alle Zellen mit denselben Laserintensitäten (50% 458 nm, 10% 514 nm) angeregt, so dass die Helligkeit der Rohdaten einen direkten Rückschluss auf den Expressionslevel des RhoA-Biosensors in der Zelle erlaubt. In den anderen fünf Experimenten wurde die Anregungsintensität der Helligkeit jeder Zelle individuell angepasst. Auch in den anderen fünf Experimenten war kein Zusammenhang zwischen Helligkeit der Rohdaten und Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder erkennbar (nicht gezeigt).

4.2.2.2 Die Signalverteilungen in FRET/YFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors waren nahezu homogen, die in YFP/CFP-Quotientenbildern dagegen nicht

Es sollte geprüft werden, ob die typische Signalverteilung in FRET/CFP-Quotientenbildern RhoA-Biosensor-exprimierender Zellen dadurch verursacht wird, dass die FRET-Effizienz des RhoA-Biosensors an unterschiedlichen Stellen in der Zelle unterschiedlich hoch ist: FRET/YFP- und YFP/CFP-Quotientenbilder derselben Zellen müssten in diesem Fall die gleichen Signalverteilungen in abgeschwächter Form zeigen. Der RhoA-Biosensor wurde in MDCK-Zellen exprimiert, die Zellen dann mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop mikroskopiert. Abbildung 4.21 A zeigt von links oben nach rechts unten das CFP-Bild einer exemplarischen Zelle, die den RhoA-Biosensor exprimiert, sowie ihre FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbilder. Abbildung 4.21 B vergleicht die Skalierungsfaktoren von FRET/YFP-, FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbildern. Diese wurden dazu auf den Skalierungsfaktor des zugehörigen CFP2/CFP-Quotientenbildes normalisiert. Die in Abbildung 4.21 B aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.13 im Anhang aufgelistet.

A)



B)

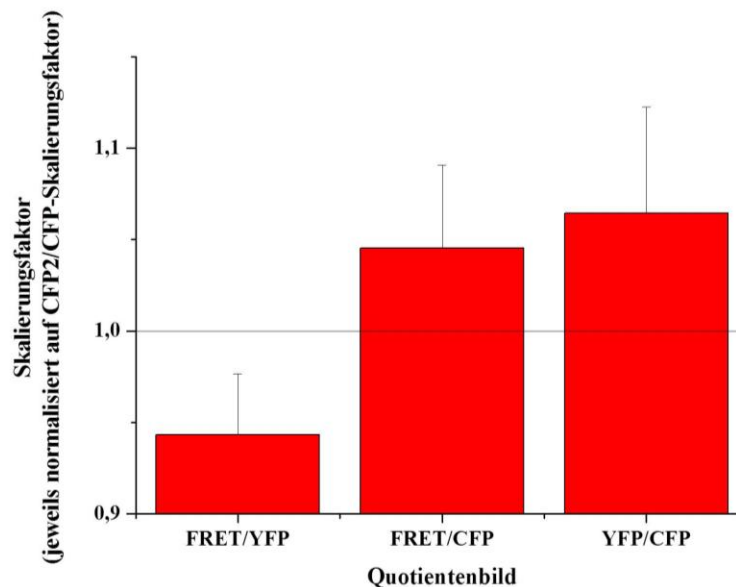


Abbildung 4.21: Die verschiedenen Quotientenbilder einer lebenden MDCK-Zelle, die den RhoA-Biosensor exprimiert: Typisches Aussehen und Größe der Skalierungsfaktoren. A) Oben links: CFP-Bild; oben Mitte: FRET/CFP-Quotientenbild; oben rechts: CFP2/CFP-Quotientenbild; unten links: YFP/CFP-Quotientenbild; unten rechts: FRET/YFP-Quotientenbild. Die Helligkeiten aller Quotientenbilder sind individuell skaliert, die Skalierungsfaktoren sind unten rechts in den Bildern angegeben. Maßstabsbalken entspricht 15 μm . B) Skalierungsfaktoren der FRET/YFP-, FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbilder, jeweils normalisiert auf den Skalierungsfaktor des zugehörigen CFP2/CFP-Quotientenbildes. Mittelwerte und Standardabweichungen von 60 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.

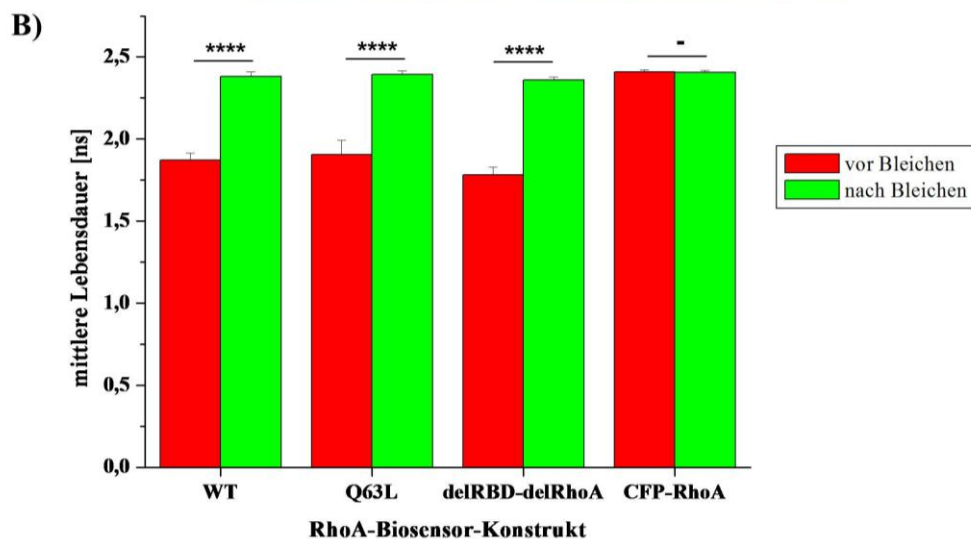
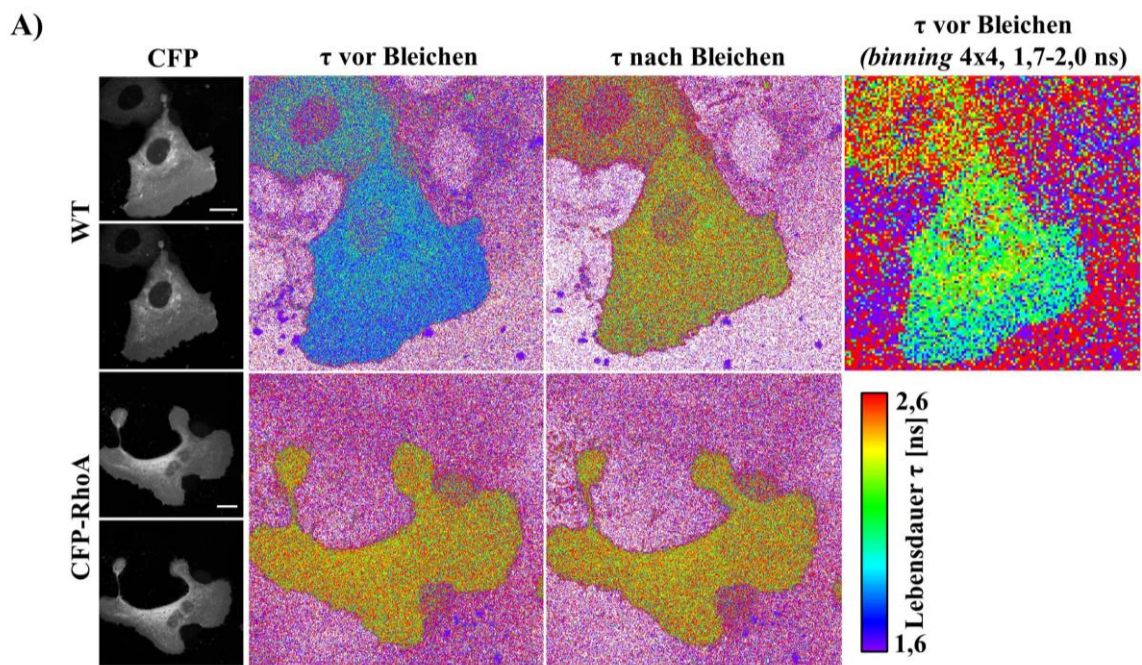
Die FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbilder in Abbildung 4.21 A zeigen das Erscheinungsbild, das bereits aus Abbildung 4.13 oben bekannt ist: In den FRET/CFP-

Quotientenbildern ist das Signal in den Membranausstülpungen erhöht, in den CFP2/CFP-Quotientenbildern ist es dagegen homogen. Das YFP/CFP-Quotientenbild ist dem FRET/CFP-Quotientenbild sehr ähnlich. Im FRET/YFP-Quotientenbild ist die Membranausstülpung jedoch nicht wie erwartet ebenfalls heller als der Zellkörper, stattdessen ist das Signal sehr homogen. Diese systematischen Ähnlichkeiten bzw. Unterschiede der verschiedenen Quotientenbilder waren für alle Experimente typisch, in denen diese vier unterschiedlichen Quotientenbilder berechnet wurden (über 40 Experimente, mehrere hundert Zellen). Das Aussehen der YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbilder war unabhängig davon, ob das YFP-Bild vor oder nach dem CFP-FRET-Bildpaar aufgezeichnet wurde (nicht gezeigt). Die Skalierungsfaktoren der FRET/YFP-Quotientenbilder waren durchschnittlich um ca. 4,7% kleiner als die der zugehörigen CFP2/CFP-Quotientenbilder (Abbildung 4.21 B). Die Skalierungsfaktoren der FRET/CFP-Quotientenbilder dagegen waren etwas über 4,5%, die von YFP/CFP-Quotientenbildern sogar nahezu 6,5% größer als die der zugehörigen CFP2/CFP-Quotientenbilder. Somit zeigten insbesondere die FRET/YFP-Quotientenbilder nicht die erwarteten ähnlichen Signalverteilungen wie die FRET/CFP-Quotientenbilder.

4.2.2.3 FLIM-Messungen am RhoA-Biosensor zeigten insgesamt viel FRET, jedoch wenig differentiellen FRET

FLIM-Messungen wurden als alternative Methode zur Bestimmung der FRET-Effizienz-Verteilung verschiedener RhoA-Biosensor-Konstrukte in lebenden Zellen genutzt. Drei verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte wurden in MDCK-Zellen exprimiert: Der funktionelle RhoA-Biosensor (WT), eine Variante, in welcher das Biosensor-RhoA durch die Mutation Q63L konstitutiv aktiv war (Q63L), sowie eine beidseitig trunkierte Variante des Biosensors ohne RBD und ohne RhoA (Δ RBD- Δ RhoA). Als Referenz für die Fluoreszenz-Lebensdauer (τ) von CFP ohne FRET-Akzeptor wurde ein CFP-RhoA-Fusionsprotein in MDCK-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und am Olympus/PicoQuant-FLIM-System mikroskopiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen insgesamt 13 WT-, 13 Q63L-, 11 Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor-exprimierende und 4 CFP-RhoA-exprimierende Zellen aufgezeichnet wurden. In einem der Experimente wurde zusätzlich in jeder Zelle nach Aufzeichnung des ersten FLIM-Bildes das YFP des Biosensors gebleicht und anschließend ein weiteres FLIM-Bild aufgezeichnet, um zu prüfen, ob etwaige intrazelluläre Variationen in der Fluoreszenz-Lebensdauer von CFP auf variablen FRET zum YFP zurückzuführen waren. Dies wurde für je 5 WT-, Q63L- und Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor-exprimierende und für 4 CFP-RhoA-exprimierende Zellen

durchgeführt. Abbildung 4.22 A zeigt Bilder exemplarischer Zellen, die den WT-Biosensor (oben), bzw. CFP-RhoA (unten) exprimieren: Gezeigt sind jeweils von links nach rechts CFP-Bilder der Zelle vor (oben) und nach (unten) Bleichen des YFP, das τ -Bild der Zelle vor Bleichen des YFP und das τ -Bild nach Bleichen des YFP. Die obere Zeile enthält ganz rechts ein weiteres τ -Bild der Zelle vor Bleichen des YFP, das zur Verbesserung des Kontrastes mit einem *binning* von 4x4 berechnet wurde. Dieses Bild ist auch abweichend von den anderen nur von 1,7-2,0 ns skaliert. Im Gegensatz zu Quotientenbildern repräsentieren in den τ -Bildern kalte Farben starken FRET. Abbildung 4.22 B vergleicht die Mittelwerte für τ aller vier Konstrukte vor und nach Bleichen des YFP. Abbildung 4.22 C vergleicht für die Biosensor-Konstrukte die Mittelwerte für β , jenen Anteil der CFP-Moleküle, der eine verkürzte Fluoreszenz-Lebensdauer aufweist, bei intaktem YFP.



(weiterer Abbildungsteil und Bildunterschrift auf der folgenden Seite)

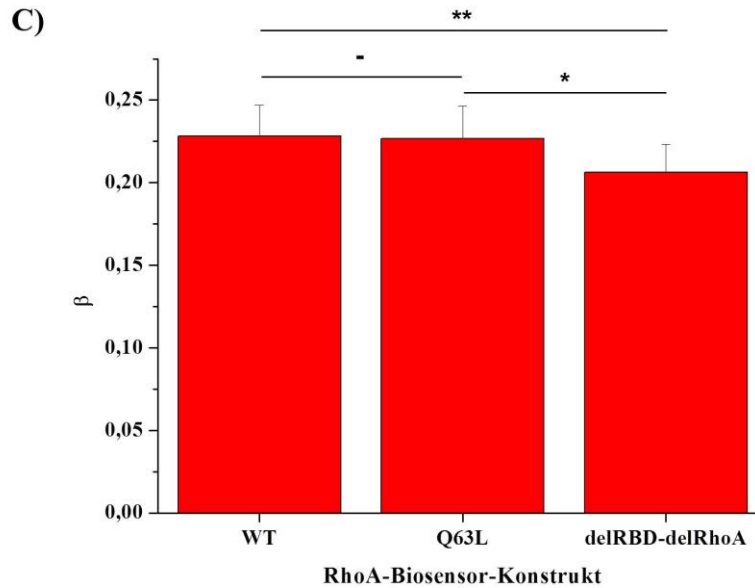


Abbildung 4.22: RhoA-Biosensor-Konstrukte zeigten insgesamt viel FRET, jedoch wenig differentiellen FRET. (Abbildungsteile A) und B) auf der vorigen Seite) A) Oben: Zelle exprimiert den WT-Biosensor; unten: Zelle exprimiert CFP-RhoA; jeweils links: CFP-Bilder vor (oben) und nach (unten) dem Bleichen des YFP, Lebensdauer vor (mittig) bzw. nach (rechts) dem Bleichen von YFP; oben ganz rechts: Lebensdauer vor dem Bleichen von YFP, jedoch mit *binning* 4x4. Alle Lebensdauer-Bilder sind skaliert von 1,6 von 2,6 ns; lediglich das Bild oben ganz rechts ist skaliert von 1,7 bis 2,0 ns. Kalte Farben sind als Regionen mit starkem FRET zu deuten. Maßstabsbalken entsprechen 15 μm . B) Mittlere Lebensdauern der vier genannten Konstrukte vor und nach dem Bleichen von YFP. Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 (Biosensor-Konstrukte) bzw. 4 (CFP-RhoA) Zellen. C) β -Werte der drei genannten RhoA-Biosensor-Konstrukte bei intaktem YFP. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 13 (WT- und Q63L-Biosensor) bzw. 11 ($\Delta\text{RBD-}\Delta\text{RhoA}$ -Biosensor) Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. p-Werte: „-“ $> 0,05$; * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; **** $\leq 0,0001$.

Die in Abbildungen 4.22 B und C aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.14 im Anhang aufgelistet. Aus Abbildung 4.22 A und B wird ersichtlich, dass sich für die RhoA-Biosensor-Konstrukte τ durch das Bleichen des YFP erhöhte. Dieser Effekt war auf die Eliminierung des Akzeptors zurückzuführen, da dieselbe Bestrahlung von CFP-RhoA keinen Einfluss auf τ hatte. Aus Abbildung 4.22 C wird ersichtlich, dass für die WT- und Q63L-Biosensor-Konstrukte bei einem signifikant größeren Anteil der Moleküle eine verkürzte Fluoreszenz-Lebensdauer auftrat als für den $\Delta\text{RBD-}\Delta\text{RhoA}$ -Biosensor. Dagegen wurde für WT- und Q63L-Biosensoren untereinander kein entsprechender Unterschied festgestellt. Abbildung 4.22 A zeigt außerdem, dass die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer bei WT-Biosensor-exprimierenden Zellen mit intaktem YFP in den Membranausstülpungen etwas geringer war als im Zellkörper, was auf verstärkten FRET in diesen Regionen hindeutet. Die τ -Bilder des Q63L-Biosensors ließen eine ähnliche Verteilung der Lebensdauern erkennen (nicht gezeigt). Mit den Kontrollen CFP-RhoA und den $\Delta\text{RBD-}\Delta\text{RhoA}$ -Biosensor trat kein entsprechender Effekt auf. Eine vergleichende Quantifizierung der Lebensdauer-Verteilungen von WT- und Q63L-Biosensor war aufgrund der ohnehin sehr flachen Verteilungen nicht möglich.

4.2.2.4 Der Raichu-RhoA-Biosensor lieferte ähnliche Ergebnisse wie der normale RhoA-Biosensor

Der Raichu-RhoA-Biosensor ist anders aufgebaut als der RhoA-Biosensor von Pertz *et al.*, sollte jedoch ebenfalls seine FRET-Effizienz in Abhängigkeit vom Nukleotid-Beladungszustand verändern (Yoshizaki *et al.*, 2003). MDCK-Zellen, die diesen Biosensor exprimierten, wurden mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen jeweils 20 Zellen aufgezeichnet wurden. Das SNR der Daten wurde vor der Auswertung mit dem PureDenoise-Makro mit manueller Rausch-Abschätzung verbessert. Abbildung 4.23 zeigt links das CFP- (oben) und das YFP-Bild (unten) einer exemplarischen, lebenden, HGF-stimulierten MDCK-Zelle, die den Raichu-RhoA-Biosensor exprimiert. Die Bilder zeigen die beiden Kanäle nach SNR-Verbesserung, jedoch vor der Hintergrund-Korrektur und der ersten Maskierung. Sie sind in Falschfarben dargestellt, um die Kontraste hervorzuheben. In der Mitte sind die FRET/CFP- (oben) und YFP/CFP-Quotientenbilder (unten) der Zelle gezeigt, ganz rechts ihre CFP2/CFP- (oben) und FRET/YFP-Quotientenbilder (unten).

Die Quotientenbilder in Abbildung 4.23 sind denen des normalen RhoA-Biosensors ähnlich (vgl. Abbildung 4.21). Ein Unterschied findet sich vor allem im FRET/YFP-Quotientenbild: Das des Raichu-RhoA-Biosensors zeigt eine ähnliche Signalverteilung, wie sie sonst für FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbilder typisch ist. Diese Signalverteilung fand sich nicht in allen FRET/YFP-Quotientenbildern des Raichu-RhoA-Biosensors, trat jedoch häufig auf. In den FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbildern dagegen ist das Signal nicht in der gesamten Membranausstülpung erhöht (rote Pfeilspitzen); stattdessen zeigen sie auch im Bereich des Zellkörpers eine Region erhöhten Signals (blaue Pfeilspitzen). Der Hintergrund der CFP- und YFP-Bilder war bei Expression dieses Konstruktes nicht homogen. Das ist auch in Abbildung 4.23 zu erkennen: Im Bildhintergrund tritt in einigen Regionen erhöhtes Signal im CFP-Kanal auf, jedoch nicht im YFP-Kanal (gelbe Pfeilspitzen). Das unregelmäßige Hintergrundsignal überlagerte auch die Zellen und war in den verschiedenen Kanälen unterschiedlich stark. Es konnte daher nicht mit Sicherheit beurteilt werden, wie ähnlich bzw. unterschiedlich die verschiedenen Quotientenbilder des Raichu-RhoA-Biosensors in Abwesenheit dieses Störsignals gewesen wären.

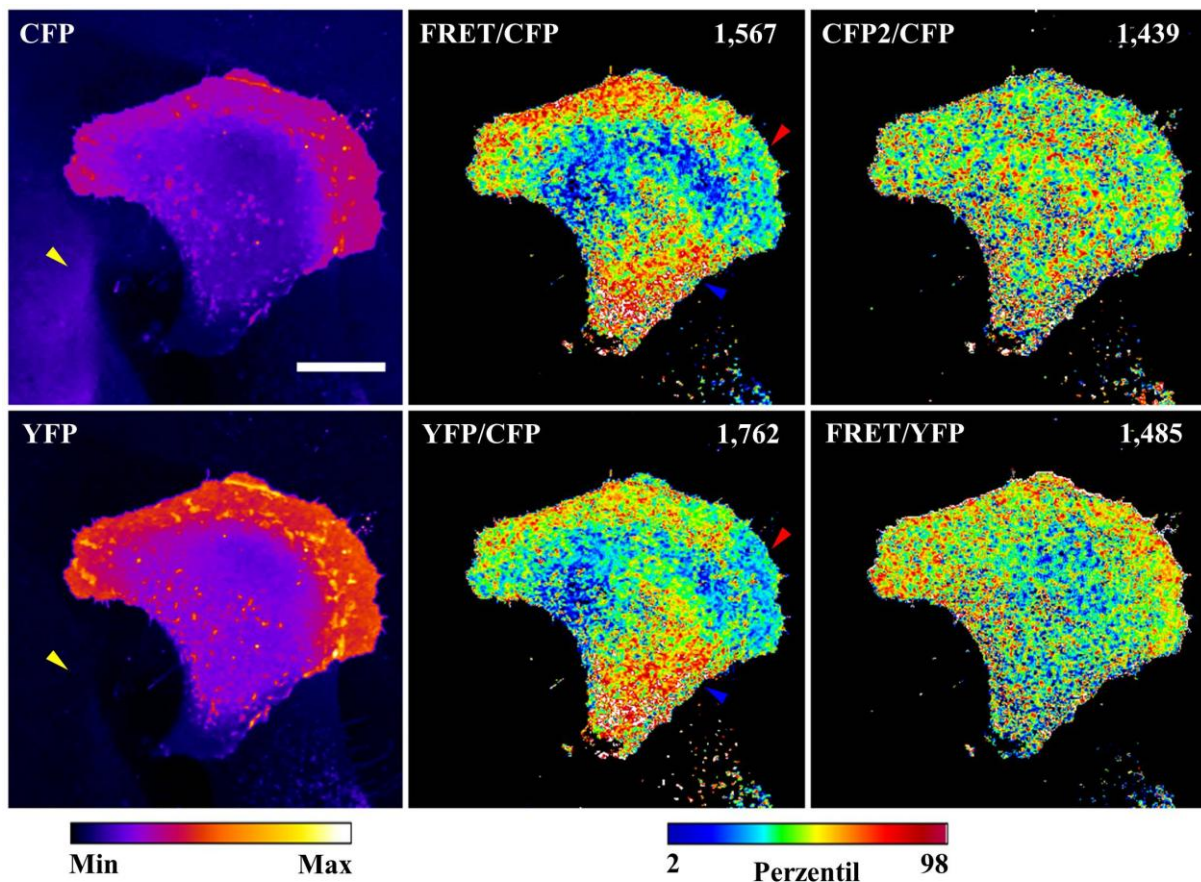


Abbildung 4.23: Typisches Aussehen der verschiedenen Quotientenbilder einer lebenden MDCK-Zelle, die den Raichu-RhoA-Biosensor exprimiert. Oben links: CFP-Bild; unten links: YFP-Bild; oben Mitte: FRET/CFP-Quotientenbild; unten Mitte: YFP/CFP-Quotientenbild; oben rechts: CFP2/CFP-Quotientenbild; unten rechts: FRET/YFP-Quotientenbild. CFP- und YFP-Bild sind weder Hintergrund-korrigiert noch maskiert. Die Helligkeiten aller Quotientenbilder sind individuell skaliert, die Skalierungsfaktoren sind oben rechts in den Bildern angegeben. Rote Pfeilspitzen: Membranausstülpung, deren FRET/CFP- bzw. YFP/CFP-Signal nicht über das des Zellkörpers erhöht ist; blaue Pfeilspitzen: Bereich erhöhten FRET/CFP- bzw. YFP/CFP-Signals im Zellkörper; gelbe Pfeilspitzen: erhöhtes Hintergrundsignal im CFP-, jedoch nicht im YFP-Bild. Maßstabsbalken entspricht 15 µm.

4.2.2.5 Die Quotientenbilder trunkierter RhoA-Biosensor-Konstrukte zeigten nahezu homogenes Signal

Drei verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte wurden in MDCK-Zellen exprimiert: Der WT-Biosensor, eine trunkierte Variante des Biosensors ohne RBD (Δ RBD) sowie der Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor. Mit diesen Konstrukten sollte überprüft werden, welche der beobachteten Signalverteilungen in den Quotientenbildern von der Fähigkeit des Biosensors abhängig sind, seine Konformation infolge der Aktivierung zu ändern. Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt, in denen jeweils 20 Zellen pro Konstrukt aufgezeichnet wurden. Lediglich in einem der Experimente wurden nur 10 Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor-exprimierende Zellen aufgezeichnet.

Abbildung 4.24 A zeigt für jedes Konstrukt Bilder einer exemplarischen Zelle aus demselben Experiment: Gezeigt sind von links nach rechts ein CFP-Bild sowie die zugehörigen FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbilder je einer WT- (obere Zeile), Δ RBD- (mittlere Zeile) und Δ RBD- Δ RhoA- (untere Zeile) Biosensor-exprimierenden Zelle. Alle Quotientenbilder sind individuell skaliert, ihre jeweiligen Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Abbildung 4.24 B vergleicht die Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder zwischen allen drei Konstrukten. Die in Abbildung 4.24 B aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.15 im Anhang aufgelistet.

An den CFP-Bildern in Abbildung 4.24 A ist zu erkennen, dass sich die drei RhoA-Biosensor-Konstrukte hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle deutlich unterscheiden: Der Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor ist hauptsächlich im Zellkörper lokalisiert, außerdem im Nukleus, dafür jedoch kaum in den dynamischen Membranausstülpungen. Die beiden anderen Konstrukte sind fast vollständig aus dem Nukleus ausgeschlossen, lokalisieren ebenfalls im Zellkörper, jedoch auch in den dynamischen Membranausstülpungen. Der Δ RBD-Biosensor lokalisiert nicht ganz so stark in den Membranausstülpungen wie der WT-Biosensor. Auch dieser recht gering wirkende Unterschied zwischen beiden Konstrukten war typisch. Der mögliche Grund für diesen Unterschied wurde in späteren Experimenten untersucht (Abschnitt 4.2.2.12). Der Vergleich der Quotientenbilder der drei Konstrukte zeigt ebenfalls Unterschiede: Die FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbilder des WT-Biosensors zeigen das systematische Muster, das bereits in Abbildung 4.21 gezeigt wurde. Diese Muster sind beim Δ RBD-Biosensor sehr viel schwächer ausgeprägt. In den Quotientenbildern des Δ RBD- Δ RhoA-Biosensors sind keine systematischen Muster erkennbar. Abbildung 4.24 B zeigt, dass die FRET/CFP-Quotientenbilder des Δ RBD-Biosensors zudem signifikant dunkler sind als die von WT- und Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor. Zwischen den FRET/CFP-Helligkeiten der beiden letztgenannten Konstrukte gibt es dagegen keinen signifikanten Unterschied. Diese beiden Konstrukte unterscheiden sich jedoch strukturell so stark, dass daraus keine Aussage über eine etwaige Ähnlichkeit abgeleitet werden sollte.

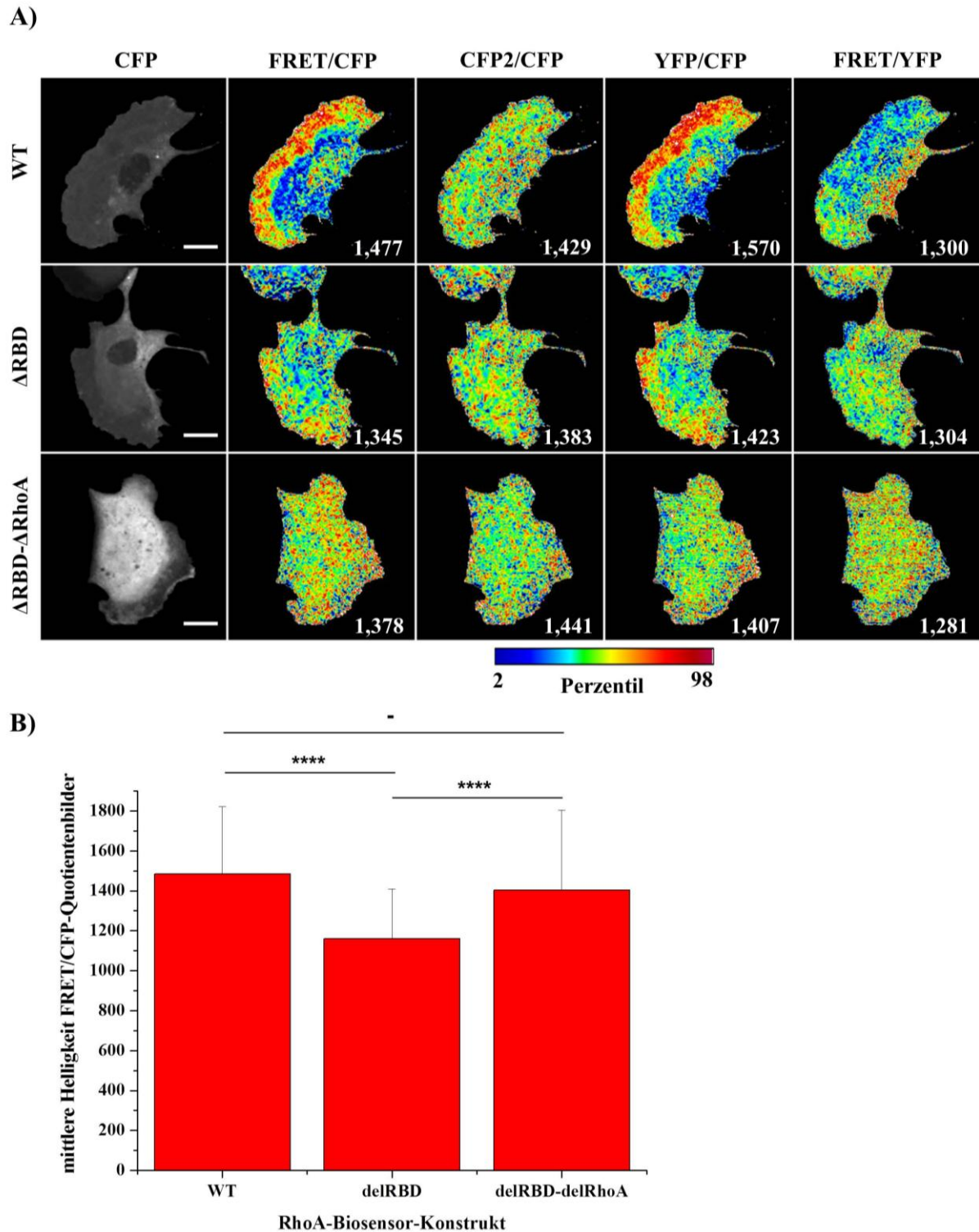


Abbildung 4.24: Veränderung der Quotientenbilder des RhoA-Biosensors durch Trunkierung: Erscheinungsbild und Helligkeit. A) MDCK-Zelle exprimiert den WT-Biosensor (oben), den Δ RBD-Biosensor (Mitte) bzw. den Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor (unten); jeweils von links nach rechts: CFP-Bild, FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbild. Die Helligkeiten aller Quotientenbilder sind individuell skaliert, die Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Maßstabsbalken entsprechen 15 μ m. B) Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder der verschiedenen Konstrukte. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 70 (Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor) bzw. 80 (WT- und Δ RBD-Biosensor) Zellen aus vier unabhängigen Experimenten. p-Werte: „-“ $> 0,05$; **** $\leq 0,0001$.

4.2.2.6 Die Quotientenbilder des konstitutiv aktiven, des konstitutiv inaktiven und des funktionellen RhoA-Biosensors zeigten die gleichen Signalverteilungen, aber unterschiedliche Helligkeiten

Es sollte überprüft werden, ob RhoA-Biosensor-Konstrukte, für die eine Änderung des Nukleotid-Bindungszustandes nicht möglich ist, dementsprechend homogene FRET/CFP-Quotientenbilder aufweisen. Dazu wurden drei verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte in MDCK-Zellen exprimiert: Der WT-Biosensor, der Q63L-Biosensor sowie eine konstitutiv inaktive Variante des Biosensors, deren RhoA-Teil die Mutation T19N trug (T19N). Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht. In fünf unabhängigen Experimenten wurden jeweils 20 Zellen pro Konstrukt aufgezeichnet.

Abbildung 4.25 A zeigt für jedes Konstrukt Bilder einer exemplarischen Zelle aus demselben Experiment: Gezeigt sind jeweils von links nach rechts ein CFP-Bild sowie die zugehörigen FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbilder je einer WT- (obere Zeile), Q63L- (mittlere Zeile) und T19N- (untere Zeile) Biosensor-exprimierenden Zelle. Alle Quotientenbilder sind individuell skaliert, ihre jeweiligen Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Abbildung 4.25 B vergleicht die mittleren Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder zwischen allen drei Konstrukten. Die in Abbildung 4.25 B aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.16 im Anhang aufgelistet.

An den CFP-Bildern in Abbildung 4.25 A ist zu erkennen, dass sich die drei RhoA-Biosensor-Konstrukte hinsichtlich ihrer Lokalisation in der Zelle nicht unterscheiden. Jedoch unterschied sich der T19N-Biosensor in der Effizienz seiner Expression von den anderen beiden Konstrukten: In MDCK-Kulturen, die mit dem T19N-Biosensor transfiziert waren, fanden sich stets weniger transfizierte Zellen, und die Expression in den transfizierten Zellen war geringer als für die beiden anderen Konstrukte (nicht gezeigt). Zellen, die den T19N-Biosensor exprimierten, bildeten auch seltener dynamische Membranausstülpungen aus als Zellen, die eines der beiden anderen Konstrukte exprimierten; die Expressionslevel und Morphologien von WT- und Q63L-Biosensor-exprimierenden Zellen unterschieden sich dagegen nicht (nicht gezeigt). Der Vergleich der Quotientenbilder zeigte keine Unterschiede: Das Signal in den FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbildern aller drei Konstrukte war in den dynamischen Membranausstülpungen erhöht. Die mittleren Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder unterschieden sich für die Konstrukte dagegen klar voneinander (Abbildung 4.25 B): Diese waren für den T19N-Biosensor signifikant dunkler, für den Q63L-Biosensor signifikant heller als für den WT-Biosensor. Der Unterschied zwischen Q63L- und WT-Biosensor war jedoch nicht in jedem Einzelexperiment signifikant (vgl. Abschnitt 4.2.2.1).

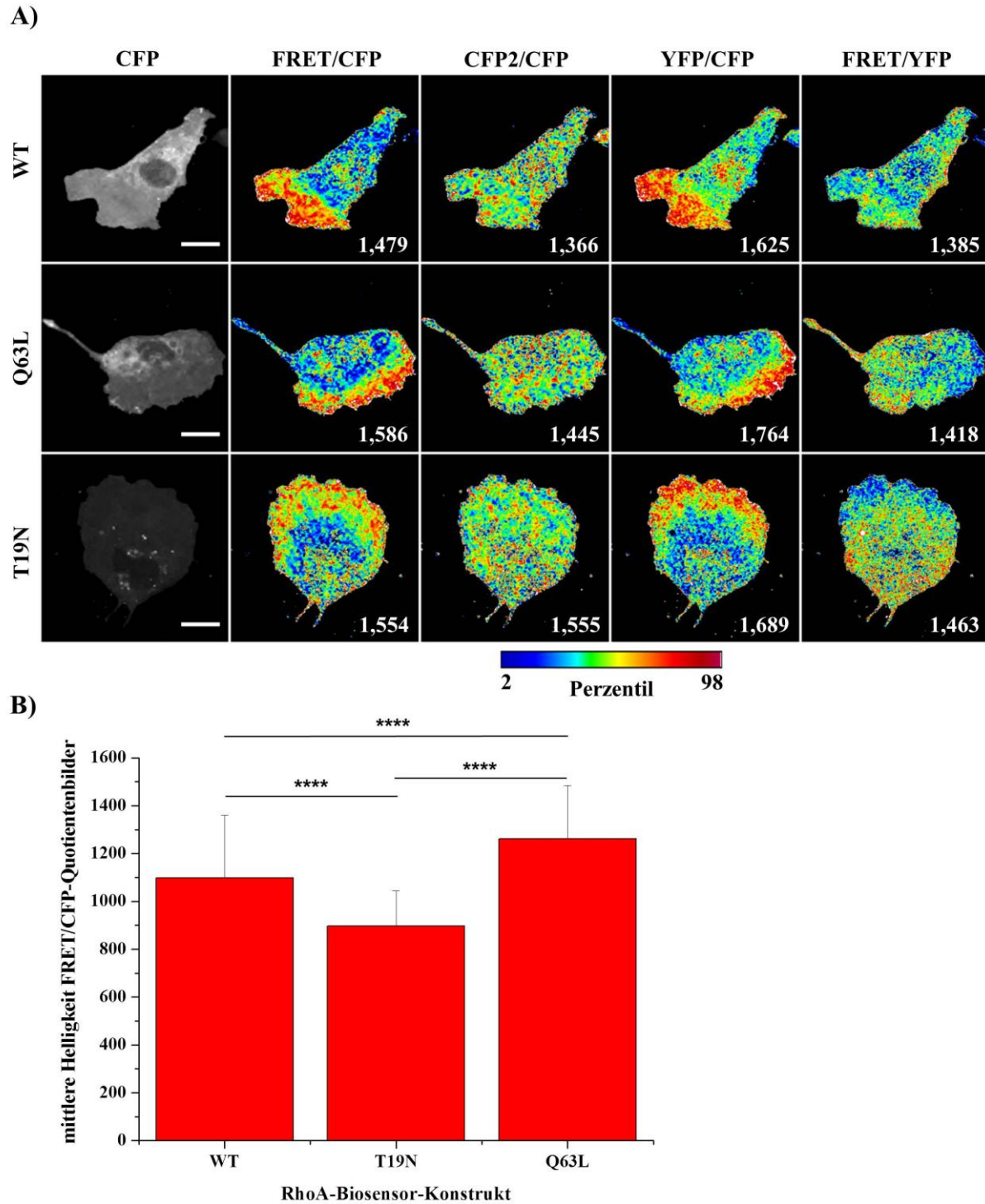


Abbildung 4.25: Quotientenbilder des RhoA-Biosensors mit konstitutiv aktivem und konstitutiv inaktivem RhoA: Erscheinungsbild und Helligkeit. A) MDCK-Zelle exprimiert den WT-Biosensor (oben), den Q63L-Biosensor (Mitte) bzw. den T19N-Biosensor (unten); jeweils von links nach rechts: CFP-Bild, FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbild. Die Helligkeiten aller Quotientenbilder sind individuell skaliert, die Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Maßstabsbalken entsprechen 15 μ m. B) Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder der verschiedenen Konstrukte. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 100 Zellen aus fünf unabhängigen Experimenten. p-Werte: **** $\leq 0,0001$.

4.2.2.7 Trunkierung der RBD wirkte auf den T19N-Biosensor anders als auf die WT- und Q63L-Biosensoren

Es sollte geprüft werden, ob durch Trunkierung der RBD in den Q63L- und T19N-Biosensoren die Signalverteilungen stark abgeschwächt werden, wie es schon für den WT-Biosensor beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 4.2.2.5). Ebenso sollte festgestellt werden, ob der Unterschied in der mittleren Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder dieser drei Konstrukte vom Vorhandensein der RBD im Biosensor-Molekül abhängig ist. Dazu wurden drei verschiedene RBD-trunkierte RhoA-Biosensor-Konstrukte in MDCK-Zellen exprimiert: Die Variante mit regulierbarem RhoA (Δ RBD), sowie eine mit konstitutiv aktivem (Δ RBD-Q63L) und eine mit konstitutiv inaktivem (Δ RBD-T19N) RhoA. Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen jeweils 20 Zellen pro Konstrukt aufgezeichnet wurden.

Abbildung 4.26 A zeigt für alle drei Konstrukte Bilder je einer exemplarischen Zelle aus demselben Experiment: Gezeigt sind jeweils von links nach rechts ein CFP-Bild sowie die zugehörigen FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbilder je einer Δ RBD- (obere Zeile), Δ RBD-Q63L- (mittlere Zeile) und Δ RBD-T19N- (untere Zeile) Biosensor-exprimierenden Zelle. Alle Quotientenbilder sind individuell skaliert, ihre jeweiligen Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Abbildung 4.26 B vergleicht die Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder der drei Konstrukte untereinander. Die in Abbildung 4.26 B aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.17 im Anhang aufgelistet.

Die drei Konstrukte unterschieden sich hinsichtlich ihrer Expressionslevel (nicht gezeigt) und Morphologien: Der Δ RBD-Q63L-Biosensor wies geringere Transfektionseffizienzen auf als die beiden anderen Konstrukte, und auch die Expressionslevel in den transfizierten Zellen waren geringer. Zellen, die den Δ RBD-Q63L-Biosensor exprimierten, bildeten außerdem seltener dynamische Membranausstülpungen aus als Zellen, die den Δ RBD-Biosensor exprimierten; bei Δ RBD-T19N-Biosensor-exprimierenden Zellen andererseits waren dynamische Membranausstülpungen häufiger und auch größer als für die beiden anderen Konstrukte. Diese Beobachtung wird in der Diskussion wieder aufgegriffen (Abschnitt 5.2.2.2.2). Der Vergleich der Quotientenbilder der drei Konstrukte in Abbildung 4.26 A zeigt einen deutlichen Unterschied: Das Signal in den FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbildern der Δ RBD- und Δ RBD-Q63L-Biosensoren ist wie erwartet nahezu homogen. Dagegen weisen die entsprechenden Quotientenbilder des Δ RBD-T19N-Biosensors wesentlich mehr Signal in den Membranausstülpungen auf als im Zellkörper. Das

FRET/YFP-Quotientenbild zeigt eine schwächere, jedoch auch deutlich erkennbare entgegengesetzte Signalverteilung. Abbildung 4.26 B zeigt für die drei Konstrukte Unterschiede in der Helligkeit ihrer FRET/CFP-Quotientenbilder: Für den Δ RBD-T19N-Biosensor waren sie am dunkelsten, für den Δ RBD-Biosensor am hellsten.

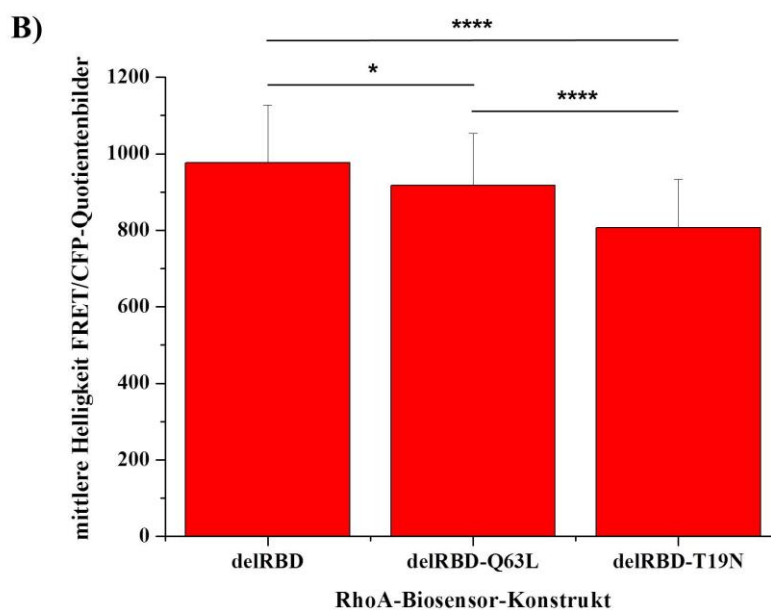
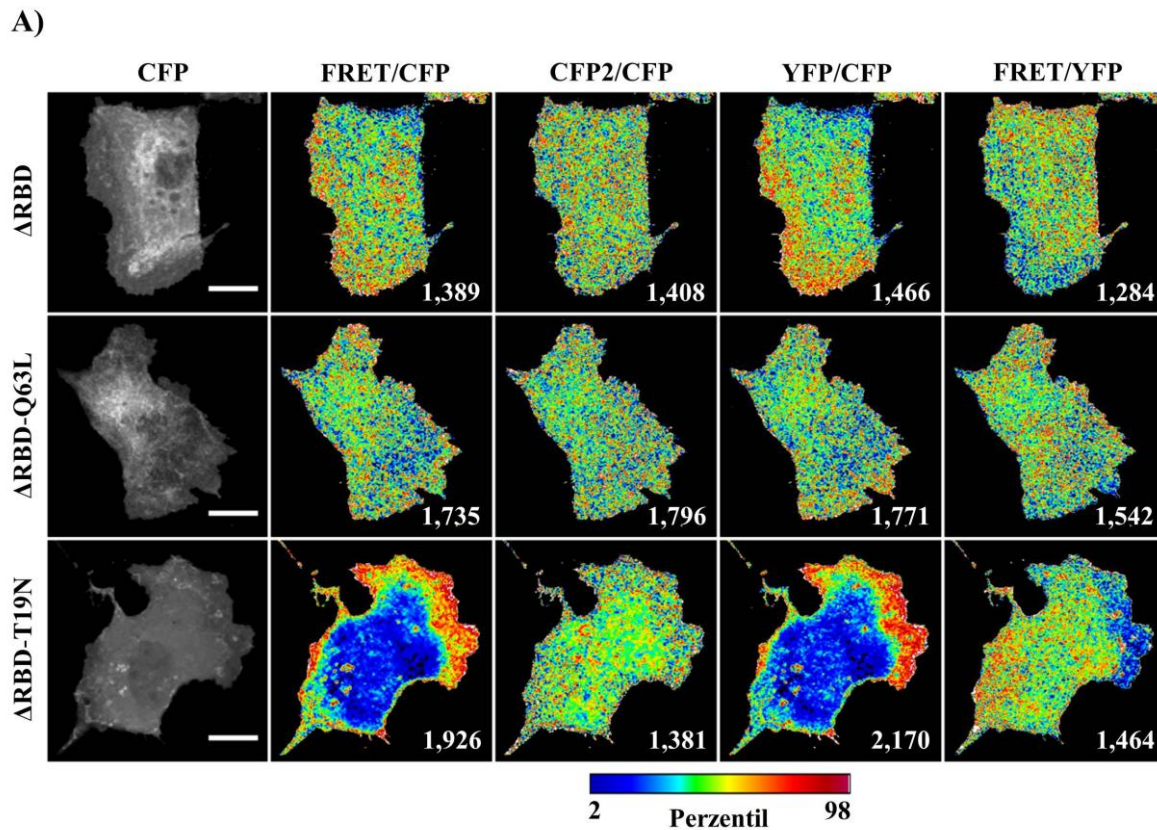


Abbildung 4.26: RBD-trunkierte Varianten des konstitutiv aktiven und konstitutiv inaktiven RhoA-Biosensors: Erscheinungsbild und Helligkeit der Quotientenbilder. A) MDCK-Zelle exprimiert den Δ RBD-Biosensor (oben), den Δ RBD-Q63L-Biosensor (Mitte) bzw. den Δ RBD-T19N-Biosensor (unten); jeweils von links nach rechts: CFP-Bild, FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbild. Die Helligkeiten aller Quotientenbilder sind individuell skaliert, die Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Maßstabsbalken entsprechen 15 μ m. B) Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder der drei Konstrukte. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 Zellen (drei unabhängige Experimente). p-Werte: * $\leq 0,05$; **** $\leq 0,0001$.

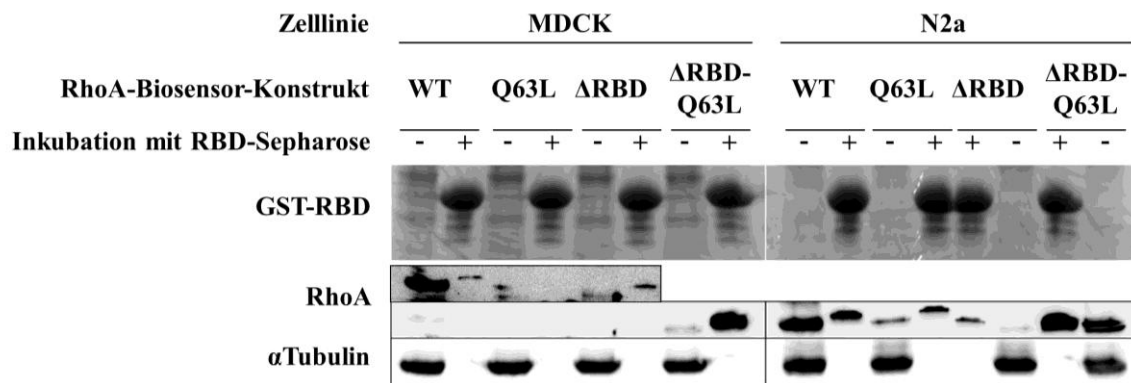
Die Helligkeiten aller Populationen unterschieden sich signifikant, allerdings war der Unterschied zwischen Δ RBD- und Δ RBD-Q63L-Biosensor so gering, dass er in keinem der Einzelexperimente signifikant war (nicht gezeigt). Ohne die RBD manifestiert sich die konstitutive Aktivierung des Q63L-Biosensors also nicht in einem helleren FRET/CFP-Quotientensignal im Vergleich zum WT-Biosensor. Wie für den WT-Biosensor, so ist auch für den Q63L-Biosensor die systematische Signalverteilung in den FRET/CFP-Quotientenbildern vom Vorhandensein der RBD im Biosensor-Molekül abhängig. Für den T19N-Biosensor gilt dies jedoch nicht.

4.2.2.8 RhoA-Biosensor-Pulldowns belegten die erhöhte Aktivität des Q63L-Biosensors und die intramolekulare Bindung an RBD

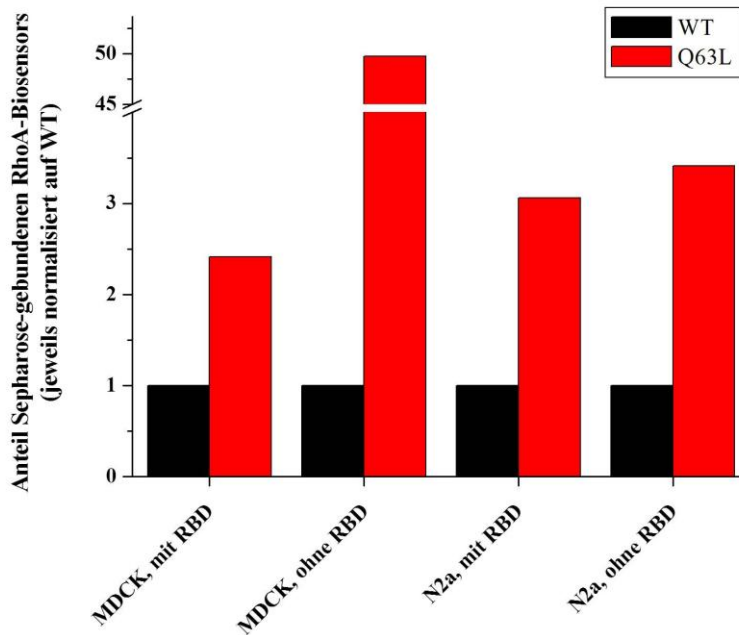
Es sollte geprüft werden, ob durch die Mutation Q63L im RhoA-Teil des Biosensors das RhoA tatsächlich konstitutiv aktiv wird. Ebenso sollte geprüft werden, ob die Biosensor-RBD für das Biosensor-RhoA tatsächlich ein potenter Bindungspartner ist. Für Aktivitäts-Pulldowns des RhoA-Biosensors wurden daher WT-, Q63L-, Δ RBD- sowie Δ RBD-Q63L-Biosensor sowohl in MDCK-Zellen, als auch in N2a-Zellen exprimiert. Aussaat und Transfektion der N2a-Zellen wurden freundlicherweise von Johannes Koch (Universität Duisburg-Essen, Abteilung für Molekulare Zellbiologie) durchgeführt. Die folgenden Schritte wurden für beide Zelllinien in gleicher Weise durchgeführt: Die Zellen wurden lysiert, mit den Lysaten RhoA-Aktivitäts-Pulldowns durchgeführt und die Proteinmengen mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion quantifiziert.

Abbildung 4.27 A zeigt die Ponceau S-gefärbten RBD-Banden nach dem Western Blot sowie die mittels Immundetektion sichtbar gemachten Proteinbanden von α -Tubulin und RhoA-Biosensor. Die Intensität der RhoA-Biosensor-Banden in den ersten sechs Spuren von links war sehr gering. Daher ist dieser Bereich noch einmal mit verstärktem Kontrast zwischen den Ponceau S-Banden und den anderen RhoA-Biosensor-Banden dargestellt. Abbildungen 4.27 B und C zeigen für jedes exprimierte Konstrukt in jeder Zelllinie den relativen Anteil Sepharose-gebundenen RhoA-Biosensors. Dieser wurde durch Division der beiden RhoA-Biosensor-Bandenintensitäten einer Probe berechnet: Im Zähler stand dabei jeweils die Intensität jener Bande, die die Menge an Sepharose-gebundenem RhoA-Biosensor zeigte, im Nenner stand die Intensität jener die Bande, die die RhoA-Biosensor-Menge ohne vorherige Inkubation mit Sepharose zeigte. Die so erhaltenen Werte wurden in den Abbildungen 4.27 B und C nach unterschiedlichen Kriterien normalisiert.

A)



B)



C)

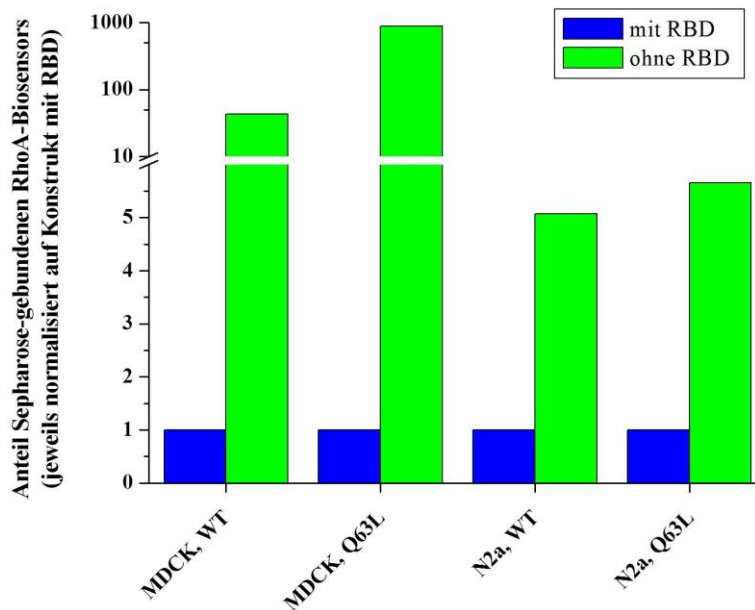


Abbildung 4.27:

Ergebnisse der RhoA-**Biosensor-Pulldowns.**

Die vier RhoA-Biosensor-Konstrukte WT-, Q63L, Δ RBD- und Δ RBD-A63L-Biosensor wurden jeweils in MDCK- und N2a-Zellen exprimiert und ein RhoA-Pulldown durchgeführt. A) Von oben nach unten: Ponceau S-gefärbte RBD-Banden nach dem Western Blot, Immundetektion der

RhoA-Biosensor-Banden, Immundetektion der α -Tubulin-Banden. Links: Lysate aus MDCK-Zellen; rechts: Lysate aus N2a-Zellen. Zuordnung der Spuren oberhalb der Ponceau S-Färbung. Linke Seite, 2. Bild von oben:

RhoA-Biosensor-Banden der Spuren 1-6 von links sind wegen der geringen Intensität auch mit erhöhtem Kontrast dargestellt. B) Vergleich der

Bindungseffizienz von WT- und Q63L-RhoA-tragenden Biosensor-Konstrukten an RBD-Sephrose: Daten sind gruppiert nach Zelllinie und Präsenz von RBD im RhoA-Biosensor; jedes Datenpaar ist jeweils auf den Wert des WT-RhoA-tragenden Konstruktes normalisiert. C) Vergleich der

Bindungseffizienz des RhoA-Biosensors an RBD-Sephrose in Abhängigkeit der Präsenz von RBD im Biosensor: Daten sind

gruppiert nach Zelllinie und Präsenz der Q63L-Mutation im RhoA; jedes Datenpaar ist jeweils auf den Wert des RBD-tragenden Konstruktes normalisiert.

Die in Abbildungen 4.27 B und 4.27 C aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.18 im Anhang aufgelistet. Die Ponceau S-Färbung in Abbildung 4.27 A zeigt, dass die Mengen zugesetzter RBD-gebundener Sepharose für alle Proben einer Zelllinie sehr ähnlich waren. An den α -Tubulin-Banden ist ersichtlich, dass auch die Gesamtmenge endogener Proteine in allen Proben einer Zelllinie sehr ähnlich war. Die stark unterschiedliche Intensität der RhoA-Biosensor-Banden zeigt jedoch, dass die Expression der verschiedenen Konstrukte sehr unterschiedlich war. Abbildung 4.27 B zeigt, dass von zwei RhoA-Biosensor-Konstrukten, die sich nur bezüglich der Präsenz der Q63L-Mutation im RhoA unterschieden, stets das Konstrukt stärker an RBD-Sepharose band, das die Q63L-Mutation trug. Demnach sind Biosensor-Konstrukte mit der Q63L-Mutation tatsächlich stets aktiver als ansonsten identische Konstrukte ohne diese Mutation. Aus Abbildung 4.27 C ist ersichtlich, dass von zwei Biosensor-Konstrukten, die sich nur durch die Präsenz von RBD unterschieden, stets das Konstrukt stärker an RBD-Sepharose band, das selbst kein RBD enthielt. Dieser Effekt trat auch zwischen Q63L- und Δ RBD-Q63L-Biosensor auf, die sich nicht hinsichtlich ihrer tatsächlichen Aktivität unterscheiden können. Daraus kann geschlossen werden, dass zwischen Biosensor-RBD und Biosensor-RhoA tatsächlich eine Bindung ausgebildet wird. Außerdem zeigt dieses Ergebnis, dass die simple Deutung des von der Sepharose eluierten RhoAs als „aktives RhoA“ nicht zulässig ist, wenn RBD-tragende und RBD-trunkierte Biosensor-Konstrukte mittels Aktivitäts-Pulldowns miteinander verglichen werden. Zu den Verhältnissen der Bindungseffizienzen bleibt noch anzumerken, dass jene Verhältnisse, die anhand der N2a-Lysate erhoben wurden, vermutlich zuverlässiger sind als jene, die anhand der MDCK-Lysate erhoben wurden, da für die MDCK-Lysate teilweise nur sehr geringe absolute Mengen des jeweiligen RhoA-Biosensor-Konstrukts nachgewiesen werden konnten.

4.2.2.9 Systematische Signalverteilungen in FRET/CFP-Quotientenbildern wurden nicht durch intrazellulär unterschiedliche ATP-Konzentrationen verursacht

Die Fluoreszenz von CFP wird durch die Gegenwart von ATP verringert, die von cerulean nicht (Borst *et al.*, 2010). Um einen möglichen Einfluss intrazellulär unterschiedlicher ATP-Konzentrationen auf die FRET/CFP-Quotientenbilder des RhoA-Biosensors zu überprüfen, wurden sechs verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte in MDCK-Zellen exprimiert: WT-, Q63L- und Δ RBD-Biosensor sowie Varianten dieser drei Konstrukte, die anstelle von CFP cerulean trugen (cerulean-, cerulean-Q63L- und Δ RBD-cerulean-Biosensor). Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht. Es

wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen jeweils 20 Zellen pro Konstrukt aufgezeichnet wurden.

Abbildung 4.28 vergleicht die Helligkeit der FRET/Donor-Quotientenbilder jedes CFP-tragenden Konstruktes mit der seines cerulean-tragenden Gegenstücks sowie die der cerulean-tragenden Konstrukte untereinander. Die in Abbildung 4.28 aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.19 im Anhang aufgelistet.

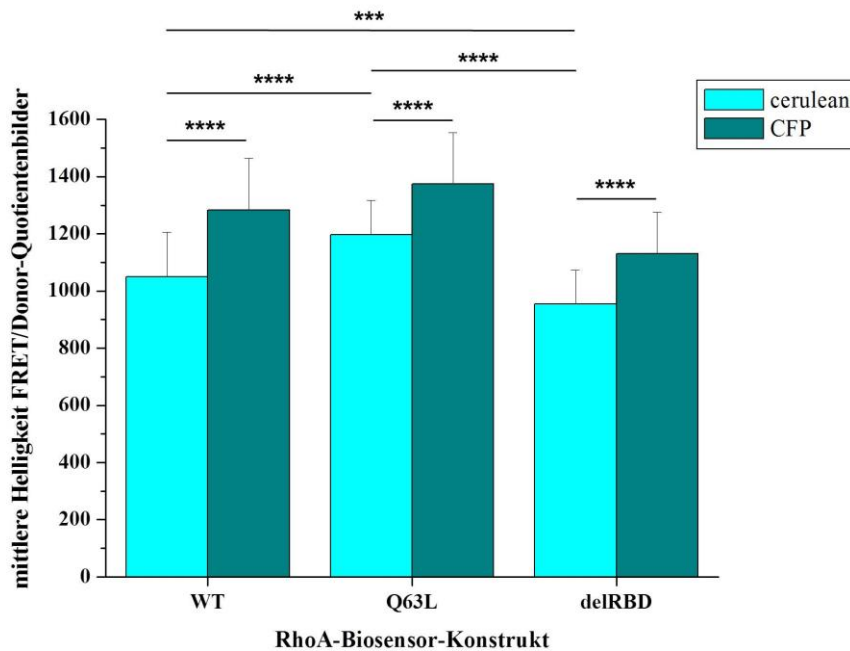


Abbildung 4.28: FRET/Donor-Quotientenbilder cerulean-tragender Biosensoren sind dunkler als die ihrer CFP-tragenden Gegenstücke. Helligkeiten der FRET/Donor-Quotientenbilder von WT-, cerulean-, Q63L-, cerulean-Q63L-, Δ RBD- und Δ RBD-cerulean-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. p-Werte: *** $\leq 0,001$; **** $\leq 0,0001$.

Abbildung 4.28 zeigt, dass für WT-, Q63L und Δ RBD-Biosensor die Helligkeit ihrer FRET/Donor-Quotientenbilder signifikant niedriger war, wenn sie als Donor cerulean statt CFP enthielten. In den Einzelexperimenten war dieser Unterschied für den Q63L-Biosensor jedoch nur in zwei von drei Fällen signifikant (nicht gezeigt). Auch die Helligkeitsunterschiede der cerulean-tragenden Konstrukte untereinander waren signifikant.

Weder für den WT-Biosensor, noch für den Q63L- oder den Δ RBD-Biosensor änderten sich durch die Mutation des CFP zu cerulean die Zellmorphologie, die Lokalisation des RhoA-Biosensors oder das Erscheinungsbild der Quotientenbilder (nicht gezeigt, für Beispiele der CFP-tragenden Konstrukte s. Abbildungen 4.25 A (WT- und Q63L-Biosensor) bzw. 4.26 A (Δ RBD-Biosensor)). Variable ATP-Konzentration ist demnach nicht der Grund für die beobachteten Signalverteilungen in FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors.

4.2.2.10 Mutationen der Phosphorylierungsstelle im Biosensor-RhoA bewirkten keine messbare Änderung der ratiometrischen Ergebnisse

RhoA kann am Serin an Position 188 phosphoryliert werden (Lang *et al.*, 1996). Verstärkte Bindung an RhoGDI ist ein Haupteffekt der Phosphorylierung (Lang *et al.*, 1996; Forget *et al.*, 2002; Ellerbroek *et al.*, 2003; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Es wurde auch beschrieben, dass exogenes RhoA, in welchem die Phosphorylierung durch die Mutation S188E imitiert wird, weniger in der aktiven, GTP-gebundenen Form vorliegt, als vergleichbare Konstrukte, die durch die Mutation S188A nicht phosphorylierbar sind (Ellerbroek *et al.*, 2003). Es sollte daher geprüft werden, ob eine vergleichbare Mutation im RhoA-Biosensor sich auch auf die Helligkeit seiner FRET/CFP-Quotientenbilder auswirkt und ob die Phosphorylierung des Biosensor-RhoAs möglicherweise sogar zu den in diesen Quotientenbildern beobachteten Signalverteilungen beiträgt. Dazu wurden sechs verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte in MDCK-Zellen exprimiert: WT- und Q63L-Biosensor sowie Varianten dieser beiden Konstrukte, in denen die Phosphorylierungsstelle an RhoA durch Mutation zerstört (S188A) oder deren Phosphorylierung imitiert (S188E) war (S188A-, S188E-, Q63L-S188A- und Q63L-S188E-Biosensor). Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht. Es wurden 20 Zellen pro Konstrukt (Q63L- und Q63L-S188A-Biosensor: je 19 Zellen) in einem Experiment aufgezeichnet.

Abbildung 4.29 vergleicht die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder aller RhoA-Biosensor-Konstrukte, die sich in genau einer Mutation voneinander unterscheiden. Die in Abbildung 4.29 aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.20 im Anhang aufgelistet.

Abbildung 4.29 zeigt, dass die Mutation der RhoA-Phosphorylierungsstelle im Biosensor keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder hatte. Ebenso änderten sich weder für den WT- noch für den Q63L-Biosensor durch eine der Mutationen an der RhoA-Phosphorylierungsstelle die Zellmorphologie, die Lokalisation des RhoA-Biosensors oder das Erscheinungsbild der Quotientenbilder (nicht gezeigt, für Beispiele der Konstrukte mit intakter Phosphorylierungsstelle s. Abbildung 4.25 A). Seine Aktivität und damit sowohl die Helligkeit seiner FRET-CFP-Quotientenbilder als auch seine Interaktion mit endogenen Effektoren scheinen also weitgehend unabhängig von der Bindung an endogenes RhoGDI zu sein.

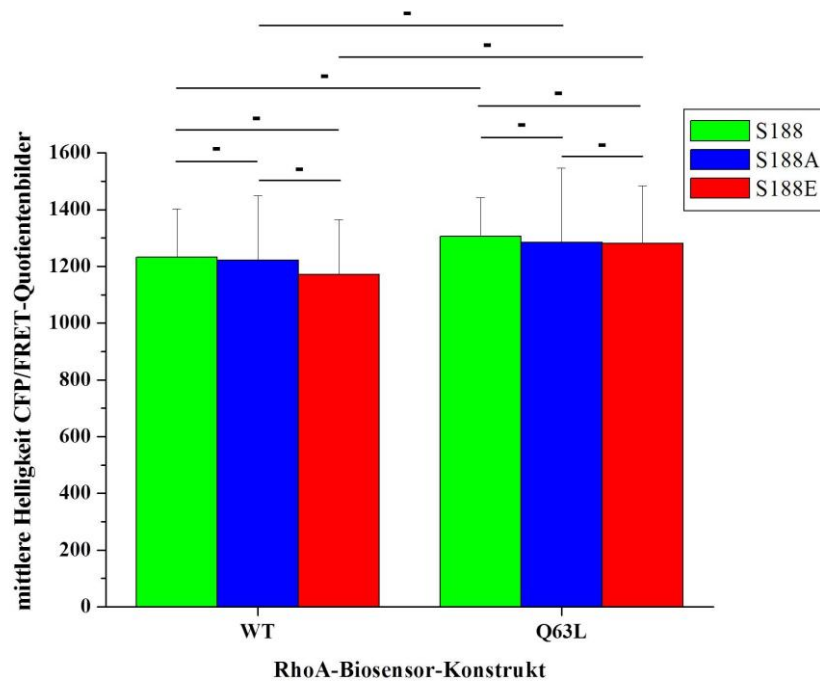


Abbildung 4.29: Die Mutation der Phosphorylierungsstelle am RhoA des Biosensors hatte keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder. Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von WT-, S188A-, S188E-, Q63L-, Q63L-S188A- und Q63L-S188E-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 20 (Q63L- und Q63L-S188A-Biosensor: 19) Zellen aus einem Experiment. p-Werte: „-“ > 0,05.

4.2.2.11 Die Mutation R68E im Biosensor-RhoA bewirkte keine signifikante Änderung der ratiometrischen Ergebnisse

Wie schon im Abschnitt 4.2.2.10 beschrieben, könnte die Fähigkeit zur Interaktion mit endogenem RhoGDI das Signal des RhoA-Biosensors verändern. Die Mutation der Phosphorylierungsstelle an RhoA, die diese Interaktion beeinflusst (Lang *et al.*, 1996; Forget *et al.*, 2002; Ellerbroek *et al.*, 2003; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005), zeigte jedoch keinen Effekt (Abbildung 4.29). Es sollte nun geprüft werden, ob die Mutation R68E im RhoA-Biosensor, die die Interaktion mit RhoGDI unterbindet (Ho *et al.*, 2008; Tkachenko *et al.*, 2011), einen messbaren Effekt auf das Signal des RhoA-Biosensor zeigt. Dazu wurden sechs verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte in MDCK-Zellen exprimiert: WT-, Q63L- und T19N-Biosensor sowie Varianten dieser drei Konstrukte, deren RhoA-Teil die Mutation R68E trug (R68E-, Q63L-R68E- und T19N-R68E-Biosensor). Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht. In drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 20 Zellen pro Konstrukt aufgezeichnet.

Abbildung 4.30 vergleicht die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder jedes R68E-tragenden Konstruktes mit der seines Gegenstücks ohne diese Mutation sowie die der R68E-Konstrukte untereinander.

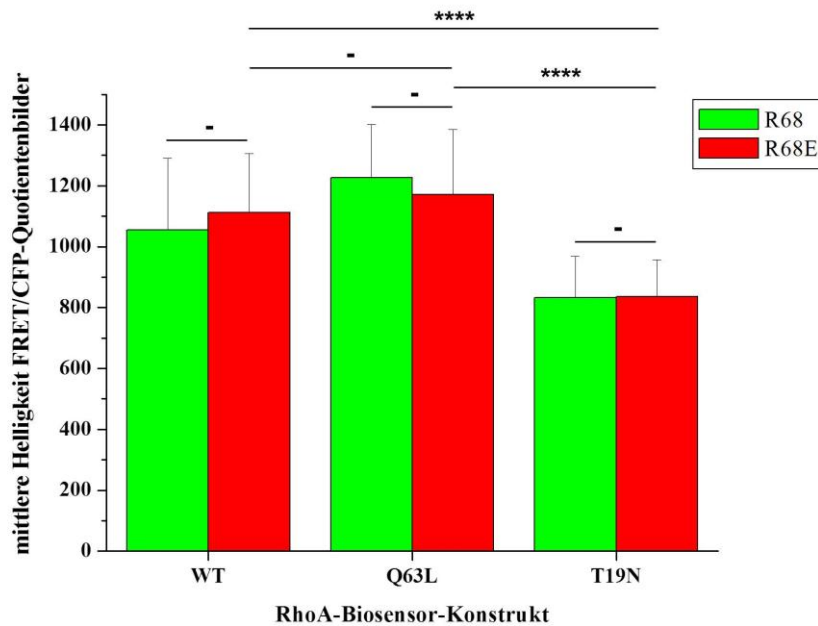


Abbildung 4.30: Die R68E-Mutation des Biosensor-RhoAs hatte keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder. Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von WT-, R68E-, Q63L-, Q63L-R68E-, T19N- und T19N-R68E-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. p-Werte: „-“ $> 0,05$; **** $\leq 0,0001$.

Die in Abbildung 4.30 aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.21 im Anhang aufgelistet. Abbildung 4.30 zeigt, dass die Mutation R68E im Biosensor-RhoA keinen signifikanten Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder hatte. Die FRET/CFP-Quotientenbilder des T19N-R68E-Biosensors waren signifikant dunkler als die des R68E- oder des Q63L-R68E-Biosensors. Der Helligkeitsunterschied zwischen den FRET/CFP-Quotientenbildern der beiden letztgenannten RhoA-Biosensoren war jedoch nicht signifikant. Weder für den WT-, noch für den Q63L- oder T19N-Biosensor änderten sich durch die Mutation R68E im Biosensor-RhoA die Zellmorphologie, die Lokalisation des RhoA-Biosensors oder das Erscheinungsbild der Quotientenbilder (nicht gezeigt, für Beispiele der Konstrukte ohne R68E-Mutation s. Abbildung 4.25 A).

4.2.2.12 In Δ RBD-Biosensor-Konstrukten bewirkte die Verringerung der RhoGDI-Interaktion verstärkte Membranlokalisierung

Bereits in Abschnitt 4.2.2.5 wurde erwähnt, dass der Δ RBD-Biosensor weniger stark in der Membran lokalisiert als der WT-Biosensor. Es sollte geprüft werden, ob RBD-trunkierte Biosensor-Konstrukte stärker mit endogenem RhoGDI interagieren und dies der Grund für ihre verringerte Membranlokalisation ist. Daher wurde in die Δ RBD- und Δ RBD-Q63L-Biosensoren dieselbe R68E-Mutation eingeführt, die schon in den RBD-tragenden Biosensoren zur Verringerung der RhoGDI-Bindung genutzt wurde (Ho *et al.*, 2008;

Tkachenko *et al.*, 2011; vgl. Abschnitt 4.2.2.11). Es wurden folglich vier verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte in MDCK-Zellen exprimiert: Δ RBD- und Δ RBD-Q63L-Biosensor sowie Varianten dieser beiden Konstrukte, in denen RhoA die Mutation R68E trug (Δ RBD-R68E-, und Δ RBD-Q63L-R68E-Biosensor). Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen jeweils 20 Zellen pro Konstrukt aufgezeichnet wurden.

Abbildung 4.31 A zeigt für alle vier Konstrukte Bilder je einer exemplarischen Zelle aus demselben Experiment: Gezeigt sind von links nach rechts ein CFP-Bild sowie die zugehörigen FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbilder. Von oben nach unten ist jeweils eine Zelle dargestellt, die den Δ RBD-Biosensor, den Δ RBD-R68E-Biosensor, den Δ RBD-Q63L-Biosensor bzw. den Δ RBD-Q63L-R68E-Biosensor exprimiert. Alle Quotientenbilder sind individuell skaliert, ihre jeweiligen Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Abbildung 4.31 B vergleicht die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder jedes R68E-tragenden Konstruktes mit der seines Gegenstücks ohne diese Mutation sowie die der R68E-tragenden Konstrukte untereinander. Die in Abbildung 4.31 B aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.22 im Anhang aufgelistet.

Vergleicht man die CFP-Bilder in Abbildung 4.31 A, so zeigt sich, dass der Δ RBD-R68E-Biosensor stärker in der dynamischen Membranausstülpung lokalisiert als der Δ RBD-Biosensor. Ob die R68E-Mutation im Δ RBD-Q63L-Biosensor den gleichen Effekt hatte, ließ sich nicht mit Sicherheit feststellen, da auch in diesen Experimenten beobachtet wurde, dass Zellen, die den Δ RBD-Q63L-Biosensor exprimierten, insgesamt weniger und kleinere dynamische Membranausstülpungen bildeten (vgl. Abschnitt 4.2.2.7). Aus Abbildung 4.31 B ist ersichtlich, dass die Mutation R68E auch in RBD-trunkierten RhoA-Biosensor-Konstrukten keinen signifikanten Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder hatte (für Ergebnisse RBD-tragender Biosensor-Konstrukte mit R68E vgl. Abbildung 4.30). Die FRET/CFP-Quotientenbilder des Δ RBD-Q63L-R68E-Biosensors waren signifikant dunkler als die des Δ RBD-R68E-Biosensors, der Unterschied war jedoch so gering, dass er nicht in jedem Einzelexperiment signifikant war (nicht gezeigt). Das deckt sich mit dem entsprechenden Vergleich, der in Abschnitt 4.2.2.7 für die Δ RBD-Q63L- und Δ RBD-Biosensoren angestellt wurde (vgl. Abbildung 4.26 B).

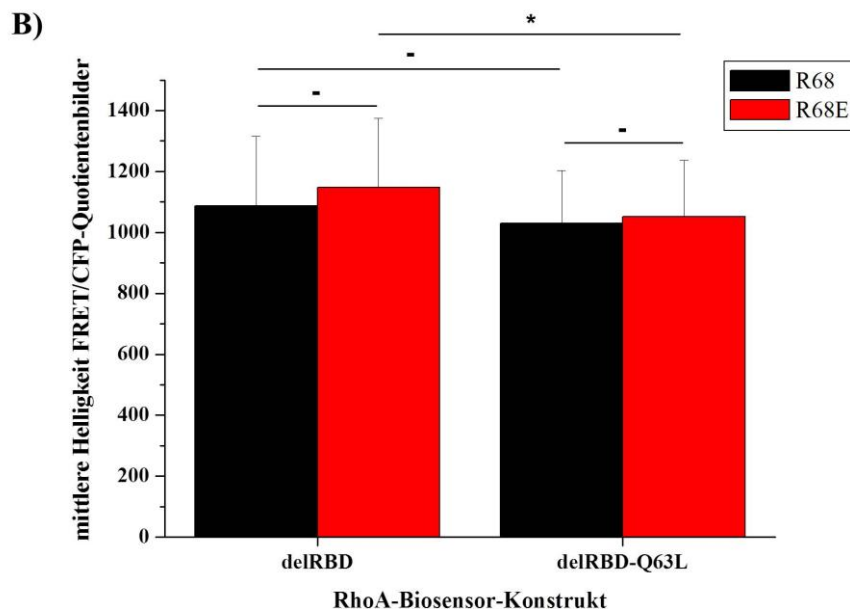
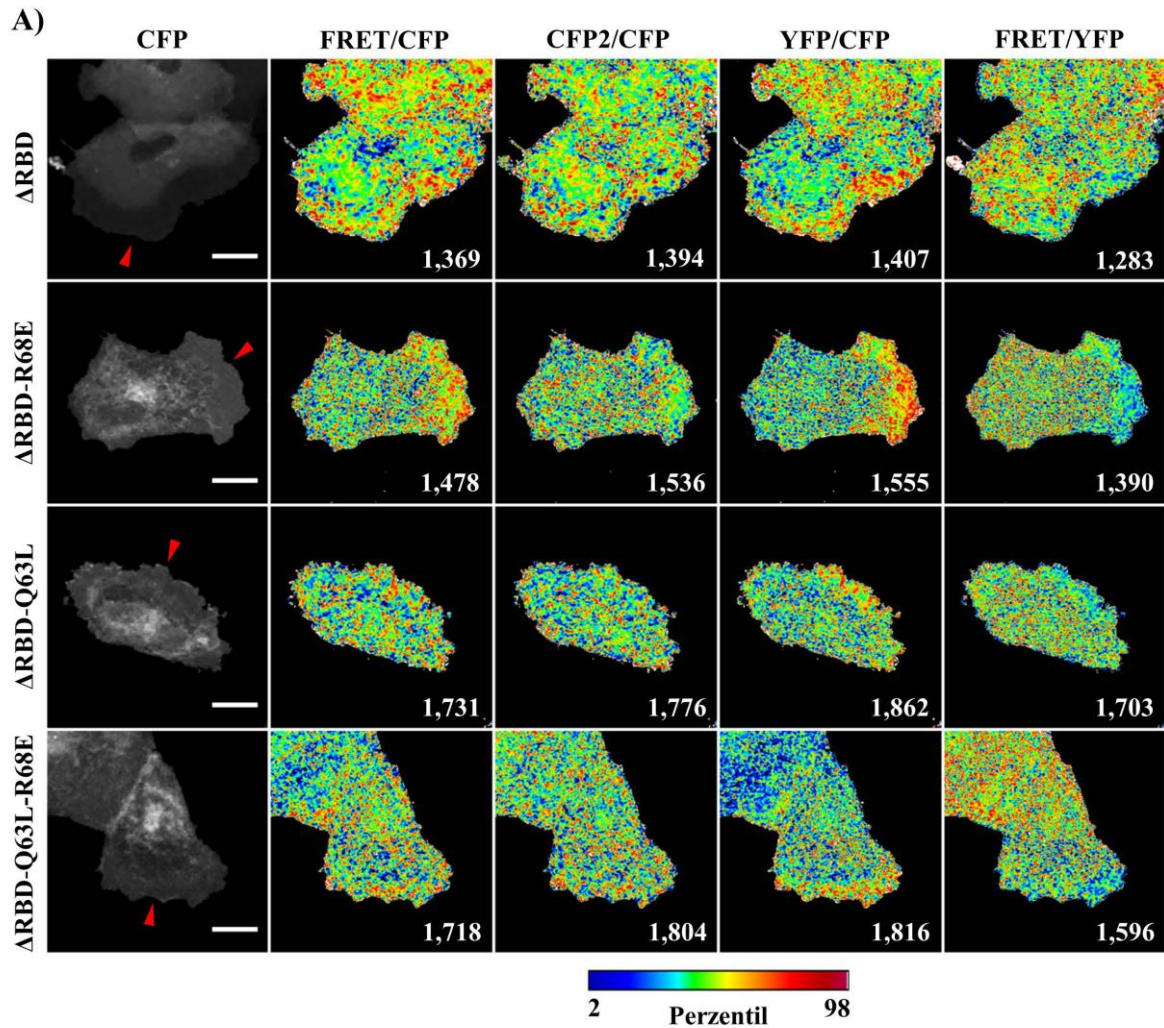


Abbildung 4.31: Die R68E-Mutation hatte in Δ RBD-Biosensor-Konstrukten zwar keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder, verstärkte aber die Membranbindung. A) Von oben nach unten: MDCK-Zelle exprimiert den Δ RBD-Biosensor, Δ RBD-R68E-Biosensor, Δ RBD-Q63L-Biosensor bzw. Δ RBD-Q63L-R68E-Biosensor; jeweils von links nach rechts: CFP-Bild, FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-

Quotientenbild. Die Helligkeiten aller Quotientenbilder sind individuell skaliert, die Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Maßstabsbalken entsprechen 15 μ m. B) Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder der vier Konstrukte. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 Zellen (drei unabhängige Experimente). p-Werte: „-“ $> 0,05$; * $\leq 0,05$.

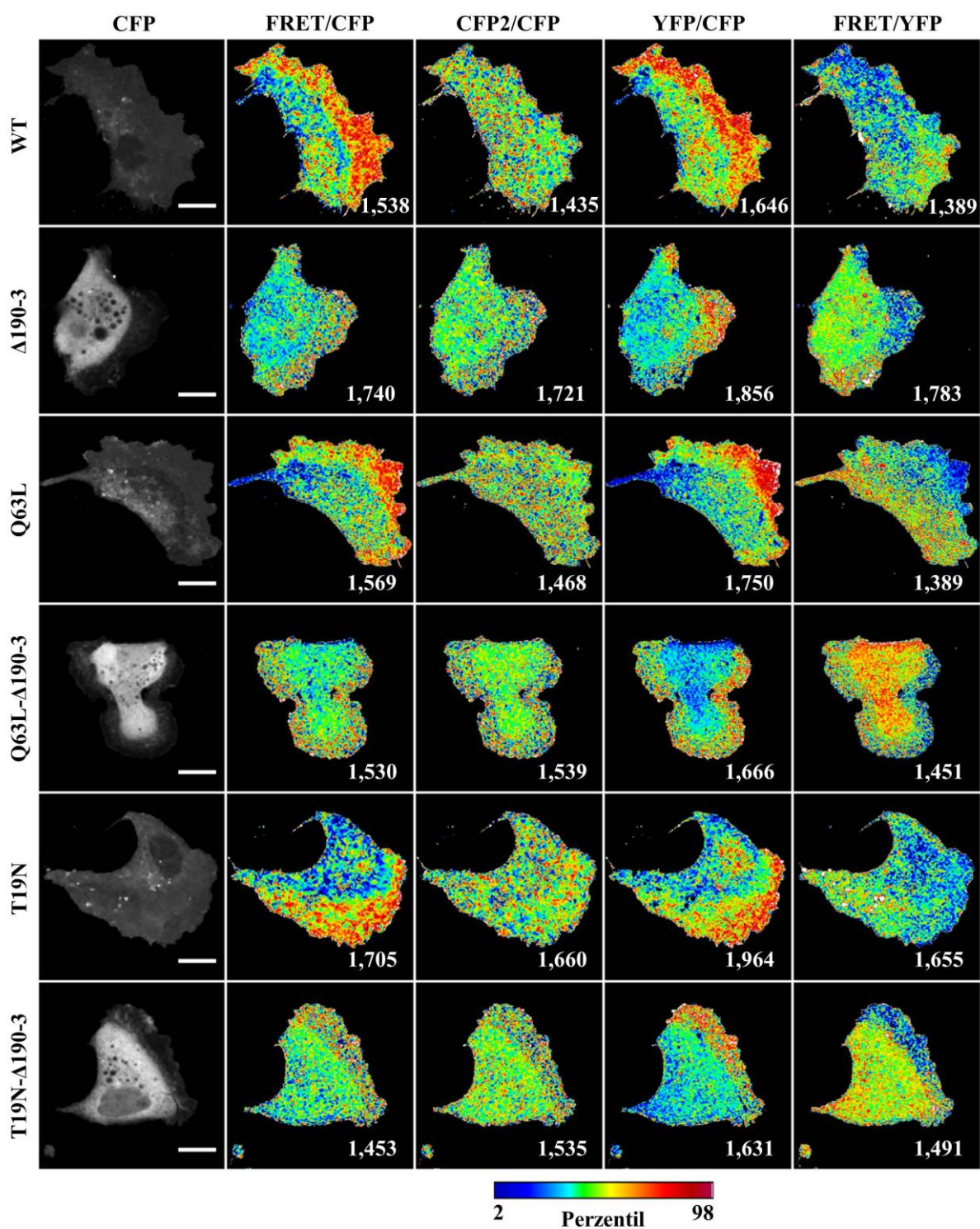
Die Ergebnisse dieser Experimente deuten darauf hin, dass die Trunkierung der RBD vom RhoA-Biosensor verstärkte Interaktion mit endogenem RhoGDI erlaubt, was die veränderte Lokalisation des Biosensors bewirkt. Umgekehrt ist davon auszugehen, dass RBD-tragende RhoA-Biosensor-Konstrukte, für die kein vergleichbarer Effekt durch die Mutation R68E gefunden wurde (Abschnitt 4.2.2.11), schon ohne diese Mutation verringerte RhoGDI-Interaktion aufweisen.

4.2.2.13 Die Membranbindung des RhoA-Biosensors ruft die Heterogenitäten in den FRET-CFP-Quotientenbildern hervor und beeinflusst deren Helligkeit

Es sollte geprüft werden, ob die Membranbindung des RhoA-Biosensors die Signalverteilung und Helligkeit seiner FRET/CFP-Quotientenbildern beeinflusst. Dazu wurden jeweils die vier C-terminalen Aminosäuren von den WT-, Q63L- und T19N-Biosensoren trunkiert, an welchen sonst die Prenylierung von RhoA erfolgt (Adamson *et al.*, 1992a). Folglich wurden sechs verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte in MDCK-Zellen exprimiert: WT-, Q63L- und T19N-Biosensor sowie Varianten dieser drei Konstrukte, in denen die vier C-terminalen Aminosäuren des RhoAs trunkiert waren (Δ 190-3, Q63L- Δ 190-3 und T19N- Δ 190-3-Biosensor). Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop untersucht. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen jeweils 20 Zellen pro Konstrukt aufgezeichnet wurden (für WT- und Δ 190-3-Biosensor wurden in einem der Einzelexperimente nur je 19 Zellen aufgezeichnet).

Abbildung 4.32 A zeigt für alle sechs Konstrukte Bilder je einer exemplarischen Zelle aus demselben Experiment: Gezeigt sind von links nach rechts ein CFP-Bild sowie die zugehörigen FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbilder. Von oben nach unten ist jeweils eine Zelle dargestellt, die den WT-Biosensor, den Δ 190-3-Biosensor, den Q63L-Biosensor, den Q63L- Δ 190-3-Biosensor, den T19N-Biosensor bzw. den T19N- Δ 190-3-Biosensor exprimiert. Alle Quotientenbilder sind individuell skaliert, ihre jeweiligen Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Abbildung 4.32 B vergleicht die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder jedes C-terminal trunkierten Konstruktes mit der seines Gegenstücks ohne diese Trunkierung sowie die der C-terminal trunkierten Konstrukte untereinander. Die in Abbildung 4.32 B aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.23 im Anhang aufgelistet.

A)



(weiterer Abbildungsteil und Bildunterschrift auf der folgenden Seite)

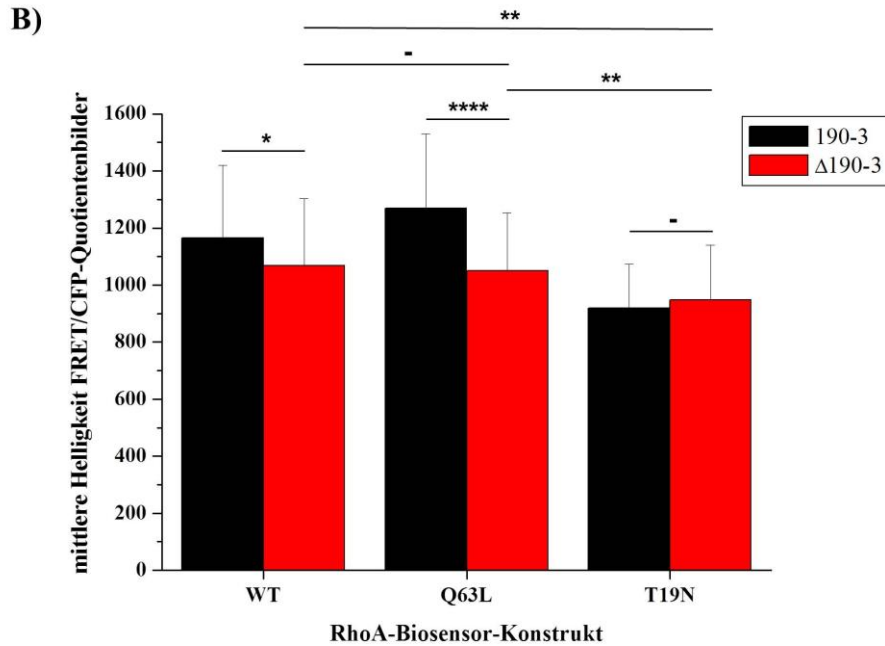


Abbildung 4.32: Die Trunkierung der CAAX-Box im RhoA-Biosensor beeinflusst sowohl das Erscheinungsbild, als auch die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder. (Abbildungsteil A) auf der vorigen Seite) A) Von oben nach unten: MDCK-Zelle exprimiert den WT-Biosensor, Δ190-3-Biosensor, Q63L-Biosensor, Q63L-Δ190-3-Biosensor, T19N-Biosensor bzw. T19N-Δ190-3-Biosensor; jeweils von links nach rechts: CFP-Bild, FRET/CFP-, CFP2/CFP-, YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbild. Die Helligkeiten aller Quotientenbilder sind individuell skaliert, die Skalierungsfaktoren sind in den Bildern angegeben. Maßstabsbalken entsprechen 15 μm. B) Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von WT-, Δ190-3-, Q63L-, Q63L-Δ190-3-, T19N- und T19N-Δ190-3-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 (WT- und Δ190-3-Biosensor: 59) Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. p-Werte: „-“ > 0,05; * ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; **** ≤ 0,0001.

In den CFP-Bildern in Abbildung 4.32 A ist zu erkennen, dass sich die Lokalisation des RhoA-Biosensors durch die Trunkierung der CAAX-Box stark änderte: Der Biosensor lokalisiert kaum noch in den dynamischen Membranausstülpungen, sondern stattdessen im voluminösen Zellkörper. Seine Lokalisation erinnert an die des beidseitig trunkierten ΔRBD-ΔRhoA-Biosensors (vgl. Abbildung 4.24 A unten). Dieser Effekt ist unabhängig davon, ob das Biosensor-RhoA regulierbar, konstitutiv aktiv oder konstitutiv inaktiv ist. Die Signalverteilung in den FRET/CFP-Quotientenbildern wird durch die Trunkierung der CAAX-Box wesentlich homogener. Ein ähnlicher, jedoch schwächerer Effekt tritt auch bei den YFP/CFP-Quotientenbildern auf. Bei den FRET/YFP-Quotientenbildern der CAAX-Box-trunkierten RhoA-Biosensoren fällt auf, dass sie eine Signalverteilung zeigen, die zu der der YFP/CFP-Quotientenbilder invers ist. Dieser Zusammenhang ist für die untrunkierten RhoA-Biosensoren weit weniger deutlich. In Abbildung 4.32 B wird deutlich, dass die mittleren Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder der WT- und Q63L-Biosensoren durch Trunkierung der CAAX-Box abnahmen, während für den T19N-Biosensor kein vergleichbarer Effekt beobachtet werden konnte. Die Helligkeiten der FRET/CFP-

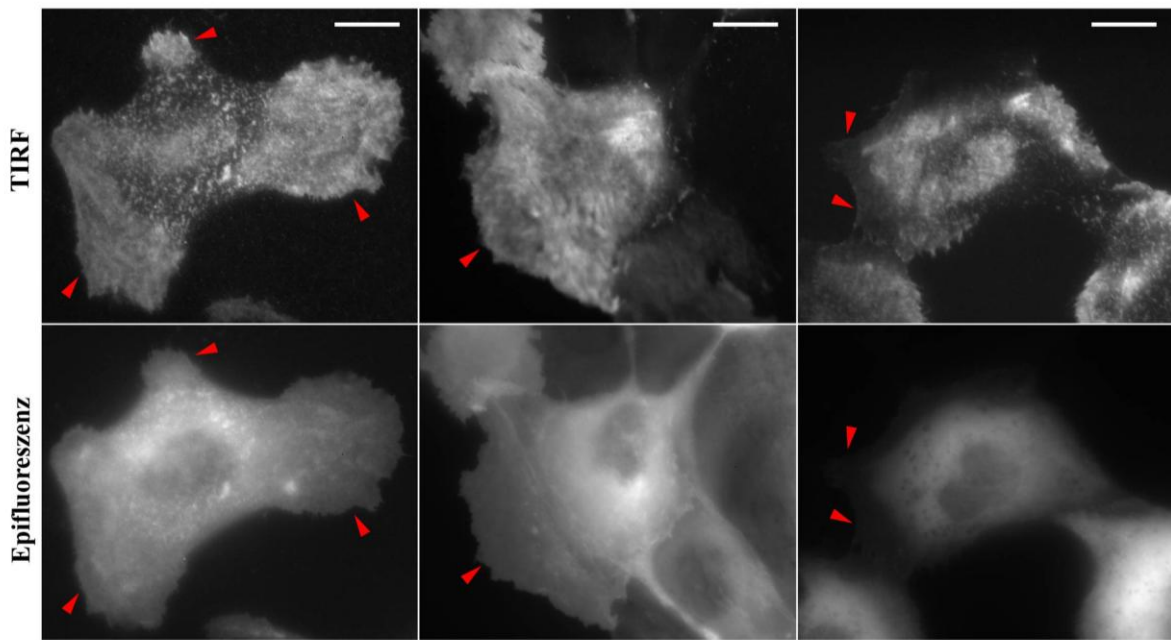
Quotientenbilder von $\Delta 190$ -3- und Q63L- $\Delta 190$ -3-Biosensor unterschieden sich untereinander nicht signifikant, waren aber beide signifikant höher als die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder des T19N- $\Delta 190$ -3-Biosensors. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindung des RhoA-Biosensors an die Membran das Helligkeitsverhältnis von FRET- zu CFP-Kanal erhöht, und dass dieser Effekt umso stärker ist, je aktiver das Biosensor-RhoA ist. Wie schon Abschnitt 4.2.2.7 zeigen sie jedoch auch, dass der T19N-Biosensor offenbar prinzipiell anderen Einflüssen unterliegt als die WT- und Q63L-Biosensoren und somit als Negativkontrolle für den WT-Biosensor ungeeignet ist.

4.2.2.14 TIRF-Mikroskopie zeigt Unterschiede in der Verteilung der Membranlokalisation verschiedener RhoA-Biosensor-Konstrukte

In MDCK-Zellen steigt die RhoA-Aktivität infolge HGF-Stimulation nicht nur an (Zondag *et al.*, 2000; Cozzolino *et al.*, 2003; Miao *et al.*, 2003), RhoA ändert dadurch auch seine bevorzugte Lokalisation: Während es in unstimulierten Zellen im Wesentlichen cytosolisch vorliegt, ist es in HGF-stimulierten Zellen hauptsächlich in den dynamischen Ausstülpungen der Membran lokalisiert (Takaishi *et al.*, 1995). Daher sollte für verschiedene Modifikationen des RhoA-Biosensors geprüft werden, ob auch sie zur Membranbindung infolge der HGF-Stimulation die dynamischen Membranausstülpungen bevorzugen. Dazu wurden acht verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte in MDCK-Zellen exprimiert: WT- und Q63L-Biosensor, $\Delta 190$ -3-Varianten beider Konstrukte, die keine Membranbindung eingehen können sowie RBD-trunkierte Varianten beider Konstrukte mit und ohne die zusätzliche Mutation R68E. Die Zellen wurden mit HGF stimuliert und die Bindung der RhoA-Biosensor-Konstrukte an die basale Plasmamembran mittels TIRF-Mikroskopie aufgezeichnet. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. In einem der Experimente wurde außerdem ein mCherry-RBD-Konstrukt exprimiert und ebenso mikroskopiert.

Die TIRF-Bilder der Zellen wurden entsprechend ihrer Signalstärke im Zellkörper und in den dynamischen Membranausstülpungen jeweils einer von drei Kategorien zugeordnet. Abbildung 4.33 A zeigt in der oberen Zeile für jede der Kategorien je ein exemplarisches TIRF-Bild aus demselben Experiment: Gezeigt sind von links nach rechts ein Bild mit verstärkter Lokalisation in Membranausstülpungen, eines mit gleichmäßiger Lokalisation und eines mit verstärkter Lokalisation im Bereich des Zellkörpers. Jeweils darunter sind die zugehörigen Epifluoreszenz-Bilder dargestellt. Abbildung 4.33 B vergleicht für alle Konstrukte die Häufigkeiten der drei Lokalisationsmuster, die Fehlerbalken sind Standardabweichungen zwischen den drei Experimenten.

A)



B)

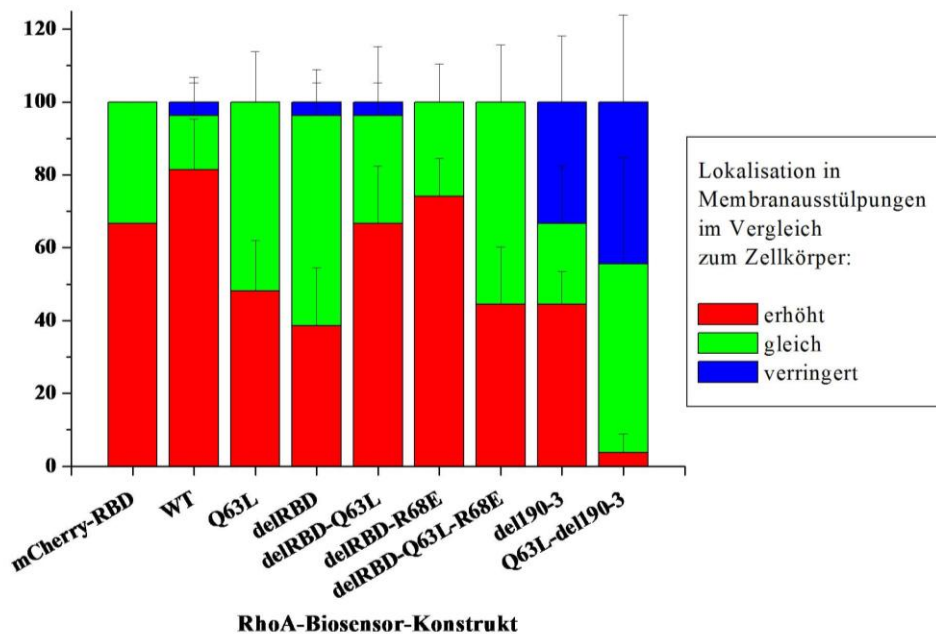


Abbildung 4.33: Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie zeigt, dass verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte bei der Membranbindung unterschiedlich stark dynamische Membranausstülpungen bevorzugen. A) Exemplarische MDCK-Zellen mit unterschiedlicher Membran-Lokalisationsverteilung der exprimierten RhoA-Biosensor-Konstrukte. Oben: TIRF-Bilder; unten: Epifluoreszenz-Bilder. Von links nach rechts: Verstärktes Signal in dynamischen Membranausstülpungen (WT-Biosensor), gleichmäßige Signalverteilung (Δ RBD-Biosensor), verstärktes Signal im Zellkörper (Δ 190-3-Biosensor). Rote Pfeile weisen auf dynamische Membranausstülpungen. Maßstabssbalken entsprechen 30 μ m. B) Prozentuale Häufigkeiten der unterschiedlichen Verteilungen an der Membran für verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte und mCherry-RBD. Pro RhoA-Biosensor-Konstrukt wurden insgesamt 27 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ausgewertet; Fehlerbalken geben die Standardabweichung zwischen den Experimenten an. Für mCherry-RBD wurden nur 9 Zellen aus einem einzelnen Experiment ausgewertet.

Die in Abbildung 4.33 B aufgetragenen Werte sind in Tabelle A.24 im Anhang aufgelistet. Aus Abbildung 4.33 B ist ersichtlich, dass sich die verschiedenen Konstrukte bezüglich ihrer Neigung, in dynamischen Membranausstülpungen zu lokalisieren, durchaus unterscheiden. Der WT-Biosensor bevorzugt zur Membranbindung die Membranausstülpungen, ebenso wie das mCherry-RBD-Konstrukt. Der Δ RBD-Biosensor dagegen bevorzugt die Membranausstülpungen weniger stark; durch die Einführung der Mutation R68E, die die Interaktion mit endogenem RhoGDI unterbindet (Ho *et al.*, 2008; Tkachenko *et al.*, 2011), wird dieser Unterschied jedoch rückgängig gemacht. Der Q63L-Biosensor zeigt ein gegensätzliches Verhalten: Hier bevorzugt das RBD-tragende Konstrukt die Membranausstülpungen weniger stark zur Bindung als das zugehörige RBD-trunkierte Konstrukt. Auch dieser Unterschied wird durch die Einführung der R68E-Mutation aufgehoben. Besonders interessant ist die Feststellung, dass selbst bei den Biosensor-Konstrukten, die nicht prenylierbar sind, der regulierbare Δ 190-3-Biosensor immer noch in etwa der Hälfte der Fälle die Membranausstülpungen zur Lokalisation bevorzugt, während der Q63L- Δ 190-3-Biosensor dort nahezu gar nicht lokalisiert ist. Die detaillierte Diskussion dieser Ergebnisse erfolgt in den Abschnitten 5.2.2.2.2 und 5.2.2.2.3. Hier soll nur angemerkt werden, dass die Tatsache, dass mCherry-RBD und der WT-Biosensor dieselben Regionen zur Membranbindung bevorzugen, darauf hindeutet, dass der WT-Biosensor tatsächlich dort an die Membran bindet, wo auch die aktive Form des endogenen RhoAs dies verstärkt tut.

5 Diskussion

5.1 Die Bedeutung von RhoA-Signalwegen in der HGF-Reaktion von A549-Zellen

Die Expression des HGF-Rezeptors c-Met in Lungentumoren ist mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf verbunden (Ichimura *et al.*, 1996; Takanami *et al.*, 1996). Die Zelllinie A549 entstammt einem Adenokarzinom der Lunge (Giard *et al.*, 1973) und exprimiert den HGF-Rezeptor (Yi *et al.*, 1998). Stimulation dieser Zelllinie mit HGF führt zu verstärkter Migration und Invasion der Zellen (Yi *et al.*, 1998). Beide Prozesse sind Voraussetzung für die Metastasierung von Tumoren (Friedl und Wolf, 2003). Kenntnis der genauen Regulation der HGF-induzierten Migration könnte daher helfen, neue Strategien zu entwickeln, um die Metastasierung von Lungentumoren zu unterdrücken. Für das RhoA-GAP 190A wurde eine Rolle in der Regulation der Migration bereits belegt (Tomar *et al.*, 2009). Es ist unter anderem Bestandteil in der EGF-induzierten Reaktion von Fibroblasten (Chang *et al.*, 1995; Haskell *et al.*, 2001). Eine mögliche Funktion von p190A in der HGF-stimulierten Migration wurde bisher noch nicht untersucht. In A549-Zellen wurde jedoch gezeigt, dass die EGF- und HGF-Reaktionen starke Überschneidungen hinsichtlich der an der Signalkaskade beteiligten Proteine aufweisen (Hammond *et al.*, 2010). Es besteht daher die Möglichkeit, dass p190A auch eine Funktion in der HGF-stimulierten Migration von A549-Zellen ausübt.

5.1.1 Sowohl die Aktivität als auch die Gesamt-Menge von RhoA werden HGF-abhängig reguliert

Zellen müssen bei der EMT eine dynamische Anpassung ihres Aktin-Zytoskeletts, ihrer Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte vornehmen. Die Beteiligung von RhoA an der Regulation dieser Strukturen wurde in zahlreichen Studien gezeigt (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996; Sahai und Marshall, 2002; Vega *et al.*, 2011). Dementsprechend wurde sowohl für MDCK-Zellen als auch für die humane Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 gezeigt, dass die EMT, zu der sie durch HGF-Behandlung angeregt werden, mit einer Erhöhung des relativen Anteils aktiven RhoAs einhergeht (Zondag *et al.*, 2000; Cozzolino *et al.*, 2003; Miao *et al.*, 2003; Wells *et al.*, 2005). Für A549-Zellen wurde jedoch noch keine vergleichbare Untersuchung durchgeführt. Nach akuter Stimulation mit HGF wurden in diesem Zellsystem zwei Effekte auf RhoA beobachtet (Abbildung 4.4): Einerseits sank die Menge des Gesamt-RhoAs zunächst ab, um anschließend wieder anzusteigen, andererseits stieg die absolute Menge aktiven RhoAs an. Diese beiden gegenläufigen Effekte lassen auf eine komplexe Regulation schließen. Eine Veränderung des Gesamt-RhoA-Gehaltes infolge HGF-

Behandlung ist zuvor nicht beschrieben worden. Jedoch ist eine vergleichbare Regulation für Rac1 bekannt: In MDCK-Zellen bewirkte mehrstündige Behandlung mit HGF nicht nur eine Erniedrigung der Rac1-Aktivität, sondern auch eine Verringerung der Rac1-Gesamtmenge durch proteasomale Degradation (Lynch *et al.*, 2006). Dass erhöhte Aktivität einer Rho-GTPase ihre proteasomale Degradation auslösen kann, wurde ebenfalls am Beispiel von Rac1 gezeigt (Doye *et al.*, 2002). Für RhoA sind zwei E3-Ligasen bekannt, die RhoA ubiquitylieren und es so der proteasomalen Degradation zuführen: Smurf-1 und Cullin-3. Beide sind für die Migration notwendig (Wang *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009). In migrierenden Zellen lokalisiert Smurf-1 in deren Leitsaum (Wang *et al.*, 2003). Einen weiteren, deutlichen Hinweis auf eine Wechselwirkung von HGF-Reaktion und proteasomaler Degradation in A549-Zellen lieferte ein siRNA-Screen von Buus *et al.*: Sie wiesen nach, dass es in A549-Zellen 12 ubiquitylierende Enzyme gibt, die für den normalen Ablauf der HGF-Reaktion notwendig sind (Buus *et al.*, 2009). Eines dieser Enzyme, USP6/TRE17, wird mit den Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 in Zusammenhang gebracht (Masuda-Robens *et al.*, 2003). Es ist daher durchaus denkbar, dass proteasomale Degradation auch für RhoA einen Regulationsmechanismus nach HGF-Behandlung darstellt. Diese Art der negativen Regulation ist irreversibel und daher wirksamer als die reversible Deaktivierung der GTPase durch GAPs. Sie ist möglicherweise ein zusätzlicher Regulationsmechanismus, der bei plötzlichen Änderungen der Umgebungsbedingungen eine Überreaktion verhindert. Weiterführende Untersuchungen könnten den Mechanismus der RhoA-Depletion nach HGF-Behandlung aufklären. Ebenso könnte geprüft werden, ob auch durch andere Stimuli, deren Einfluss auf die relative Menge aktiven RhoAs bekannt ist, gleichzeitig die absolute Menge an RhoA verändert wird. So könnte auch für RhoA genauer definiert werden, welche Rolle seine verstärkte Degradation im komplexen Regulationsnetzwerk spielt.

5.1.2 RhoA-Aktivitäts-Pulldowns deuten darauf hin, dass p190A an der HGF-abhängigen Regulation von RhoA beteiligt sein könnte

Zur Untersuchung der Auswirkung der p190A-Depletion auf die HGF-induzierten Effekte auf RhoA wurden Pulldown-Experimente, analog zu den bereits in Abschnitt 5.1.1 besprochenen Experimenten, durchgeführt (Abbildung 4.8). Die nt-siRNA-behandelten Zellen erbrachten dabei ähnliche Ergebnisse wie Zellen, die nicht mit siRNA behandelt wurden (vgl. Abbildung 4.4 B): Die Menge aktiven RhoAs stieg an, während die Gesamt-Menge an RhoA sich verringerte. Die Behandlung mit nt-siRNA beeinträchtigte die Regulation der Aktivität oder Gesamtmenge von RhoA also nicht. Auch in p190A-depletierten Zellen stieg die absolute

Menge aktiven RhoAs durch die HGF-Behandlung an. Jedoch verringerte die HGF-Behandlung nicht die RhoA-Gesamtmenge in p190A-depletierten Zellen. Der relative Anteil aktiven RhoAs am Gesamt-RhoA stieg für p190A-depletierte Zellen dementsprechend stärker an als für nt-siRNA-behandelte Zellen.

Sollte sich dieses Ergebnis reproduzieren lassen, würde dies tatsächlich auf eine Kompensationsreaktion der Depletion hindeuten: Die Depletion von p190A – also eines RhoA-Deaktivators – ließe erwarten, dass die absolute Menge aktiven RhoAs ansteigt. Dies war im vorliegenden Experiment jedoch nicht der Fall. Stattdessen unterschieden sich p190A-exprimierende und p190A-depletierte Zellen in ihrer Gesamt-RhoA-Menge.

Erste Erkenntnisse über einen möglichen Kompensationsmechanismus könnten gewonnen werden, indem die Mengen an aktivem RhoA und auch an Gesamt-RhoA, die in p190A-depletierten und nt-siRNA-behandelten Zellen in Abwesenheit von HGF vorliegen, direkt miteinander verglichen werden: In Melanom-Zellen erhöhte die siRNA-vermittelte p190A-Depletion die relative Menge aktiven RhoAs ungefähr um den Faktor 3 (Molina-Ortiz *et al.*, 2009). Dagegen zeigten p190A^{-/-}-MEFs keine konstitutive Erhöhung der RhoA-Aktivität gegenüber Wildtyp-MEFs (Wennerberg *et al.*, 2003). Die Autoren der Studie vermuteten eine Anpassungsreaktion der dauerhaft p190A-defizienten Zellen. Für weitere Untersuchungen sollten auch die Mengen an aktivem Rac1 und Gesamt-Rac1 p190A-depletierter und nt-siRNA-behandelter Zellen miteinander verglichen werden, da die p190A-Depletion sich durchaus auch auf die Rac1-Aktivität auswirken könnte: p190A zeigt nicht nur gegenüber RhoA GAP-Aktivität, sondern auch gegenüber Rac1 (Ligeti *et al.*, 2004). Die Spezifität für eine bestimmte GTPase wird dabei durch die Interaktion mit bestimmten Phospholipiden bestimmt; die Effizienz dieser Interaktion wiederum ist abhängig von der Phosphorylierung des GAPs an S1221 und T1226 (Lévay *et al.*, 2009). Falls die p190A-Depletion tatsächlich nicht nur die Menge und/oder Aktivität von RhoA, sondern auch die von Rac1 ändert, sollte daher auch der Phosphorylierungsstatus dieser Aminosäuren im verbliebenen p190A untersucht und mit dem nt-siRNA-behandelten Zellen verglichen werden. *In vivo* ist jedoch bislang nur die einseitige Koppelung der RhoA- und Rac1-Aktivitäten durch p190A dokumentiert: Rac1-Aktivität vermittelt die Aktivierung von p190A, was zur Inaktivierung von RhoA führt (Nimnual *et al.*, 2003; Noren *et al.*, 2003; Liang *et al.*, 2004). Untersuchungen über die Veränderung der Rac1-Aktivität durch p190A-Depletion sind aus der Literatur bislang nicht bekannt.

5.1.3 Die automatisierte Bildauswertung ist leistungsfähig genug zur Detektion von leichten Bewegungs-Phänotypen

Die HGF-Reaktion p190A-depletierter und nt-siRNA-behandelter A549-Zellen wurde anhand von Phasenkontrast-Filmen verglichen. Bei der ersten optischen Beurteilung der Filme wurde jedoch kein Phänotyp der p190A-Depletion festgestellt. Daher sollten die Filme mit automatisierter Bildanalyse untersucht werden, um sie bei geringem Arbeitsaufwand dennoch auf einen möglichen, schwachen Phänotyp hin zu untersuchen. Die Quantifizierung der absoluten bewegten Flächen in den Filmen war dabei technisch einfach. Um jedoch eine Verfälschung der Daten durch unterschiedliche Zelldichten in den aufgezeichneten Gesichtsfeldern auszugleichen, mussten die Zelldichten ebenfalls quantifiziert werden. Die Analyse fluoreszenz-mikroskopischer Aufnahmen ist vergleichsweise einfach, da hier helle Objekte (Zellen oder Organellen) vor dunklem Hintergrund betrachtet werden. Die in dieser Arbeit zur Bildanalyse verwendete Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) enthält diverse Funktionen, um Anzahl, Fläche und Form von Objekten zu analysieren, die sich in ihrer Helligkeit deutlich vom Hintergrund abheben. Diese Analysen nutzen einen (automatisch oder manuell gewählten) Helligkeits-Schwellenwert, um Objekte und Hintergrund voneinander zu trennen. Für Phasenkontrast-Filme ist dies nicht möglich, da sich dort die betrachteten Zellen nicht durch ihre Helligkeit, sondern durch erhöhten Kontrast vom Hintergrund abheben. Aufgaben wie die automatisierte korrekte Segmentierung einzelner Zellen voneinander oder die automatisierte Verfolgung ihrer Migration in Phasenkontrast-Filmen sind daher Gegenstand aktueller Publikationen (Huang *et al.*, 2012; Massoudi *et al.*, 2012; Chalfoun *et al.*, 2013). Die akkurate Identifikation jener Teile eines Phasenkontrast-Bildes, die von Zellen eingenommen werden, ist eine notwendige Voraussetzung für solche Analysen und immer noch ein aktuelles Problem (Chalfoun *et al.*, 2013). Dennoch konnte in dieser Arbeit mit einfachsten Mitteln und ausreichender Genauigkeit die automatisierte Zelldichte-Analyse in ImageJ realisiert werden (Abbildung 4.1). Die recht hohe Standardabweichung der Differenz zwischen automatisch und manuell quantifizierten Zelldichten zeigt jedoch auch, dass die Quantifizierungen in einem Einzelbild sich dennoch um mehrere Prozent unterscheiden können. Sofern für zukünftige Untersuchungen kein leistungsfähigeres Zelldichte-Makro für Phasenkontrast-Bilder zur Verfügung steht, sollte dieses Makro daher so angewandt werden, dass die Genauigkeit optimiert wird: So sollten, wie in dieser Arbeit geschehen, immer die Zelldichten in mehreren Gesichtsfeldern derselben Kondition quantifiziert und die Ergebnisse summiert werden. Ebenso sollten die Variablen für jede Zelllinie separat optimiert werden, da unterschiedliche Morphologien auch die Stärke der

beiden Quantifizierungsfehler beeinflussen: Für Zelllinien, die grundsätzlich kaum auf dem Substrat ausgebreitet sind, werden andere Variablen optimal sein als für Zelllinien, die sehr flach adhärieren (Abbildung 4.1 B).

Die Ergebnisse, die das Bewegungs-Makro in Kombination mit dem Zelldichte-Makro erbrachte, passten gut zur optischen Beurteilung der Phasenkontrast-Filme: Die Zellen reagierten sofort auf die HGF-Zugabe, indem sie Membranausstülpungen in schnell aufeinanderfolgenden Zyklen bildeten und zurückfalteten. Diese erste Phase der HGF-Reaktion hielt nicht lange an: Optisch wurde abgeschätzt, dass die Zyklen von Membranausstülpung und –rückfaltung nach ca. 20 min zunehmend langsamer wurden. Durch das Bewegungs-Makro wurde sowohl die erste Phase starker Bewegung, als auch deren allmähliches Abfallen verzeichnet. Die Versuche mit RhoA-depletierten A549-Zellen zeigten außerdem, dass das Makro selbst einen leichten Bewegungs-Phänotyp reproduzierbar nachweisen konnte (Abbildung 4.9 B-D).

5.1.4 Die Stärke der HGF-Reaktion wird durch die experimentell erreichte p190A-Depletion nicht beeinflusst

Die Bewegungs-Analyse an Phasenkontrast-Zeitraffer-Filmen von p190A-depletierten und nt-siRNA-behandelten Zellen zeigte keinen signifikanten Effekt der Depletion auf die HGF-induzierte Bewegung (Abbildung 4.7). Die Ergebnisse der Bewegungs-Analyse stimmte hierin mit der optischen Beurteilung der Zellen überein: Auch im sonstigen Erscheinungsbild der Zellen war kein Phänotyp erkennbar. Die Depletion von p190A war allerdings in keinem der Experimente annähernd vollständig. Die effizienteste Depletion, die in Einzelexperimenten erreicht werden konnte, lag bei ca. 80%, und auch in diesen Einzelexperimenten war kein Phänotyp erkennbar. Experimentelle Bedingungen, bei denen eine effizientere Depletion erreicht wurde, zeigten selbst für nt-siRNA behandelte Zellen cytotoxische Effekte (nicht gezeigt). Es ist jedoch bekannt, dass die Mutation R1283K in p190A seine GAP-Aktivität eliminiert, ohne jedoch die Bindung zu RhoA zu behindern (Li *et al.*, 1997). Für p190A R1283A wiederum wurde gezeigt, dass es in der Zelle die Funktion des endogenen Proteins behindert, also dominant inaktiv wirkt (Arthur *et al.*, 2000). Expression geringer Mengen dieser dominant inaktiven Mutante in p190A-depletierten Zellen könnte daher einen Phänotyp zeigen, der durch die teilweise Depletion alleine nicht auftrat. Folglich bestehen nach wie vor drei mögliche Erklärungen für das Fehlen eines p190A-Depletions-Phänotyps: 1) p190A spielt möglicherweise keine Rolle in der HGF-verursachten RhoA-Regulation; 2) die Depletion des Proteins könnte nicht effizient genug gewesen sein; 3)

die RhoA-Regulation infolge HGF-Stimulation könnte, wie schon in Abschnitt 5.1.1 angedeutet, so komplex sein, dass das Fehlen des einzelnen Regulators p190A durch andere Komponenten kompensiert wurde. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die siRNA-vermittelte Depletion von p190A in anderen Studien phänotypisch wirksam war, obwohl auch dort die Depletion bei Weitem nicht vollständig war: So führte schon allein die Verringerung der p190A-Menge zu Polarisationsdefekten migrierender Fibroblasten (Tomar *et al.*, 2009). Die Verstärkung von Semaphorin-Signalen in Fibroblasten führte zu einer Verlangsamung von Adhäsion und Ausbreitung der Zellen; auch dieser Effekt wurde schon nahezu vollständig unterbunden, wenn p190A nur teilweise depletiert wurde (Barberis *et al.*, 2005).

5.1.5 Die beiden RhoA-depletierenden siRNAs zeigten entgegengesetzte Effekte auf die Bewegung von A549-Zellen

Da die erreichte p190A-Depletion keinen Einfluss auf die Bewegung von A549-Zellen nach HGF-Behandlung gezeigt hatte (vgl. Abschnitt 5.1.4), sollte geprüft werden, welchen Einfluss die Depletion von RhoA selbst in diesen Messungen hat. Dazu wurden jene siRNAs verwendet, die sich für die Untersuchung der RhoA-Depletion in einer anderen Zelllinie bewährt hatten (persönliche Rücksprache mit Olga Müller, Universität Duisburg-Essen, Abteilung für Molekulare Zellbiologie). Die Depletion von RhoA mit zwei unterschiedlichen siRNAs gleicher Effizienz zeigte widersprüchliche Auswirkungen auf die HGF-Reaktion von A549-Zellen: Die Depletion von RhoA mit siRhoA#6 führte sowohl bei unstimulierten, als auch bei HGF-stimulierten Zellen zu einer verstärkten Bewegung; dieser Effekt blieb bei Depletion von RhoA mit siRhoA#8 aus (Abbildung 4.9 B und C). siRhoA#6-behandelte Zellen verstärkten dafür ihre Bewegungen infolge der HGF-Zugabe um einen geringeren Faktor als nt-siRNA-behandelte Zellen, bei siRhoA#8-behandelte Zellen dagegen war die Verstärkung tendenziell größer (Abbildung 4.9 D). Die systematischen Unterschiede deuten auf *off-target*-Effekte der siRNAs hin. Dementsprechend zeigten Microarray-Untersuchungen, die den Effekt beider siRNAs in einer anderen Zelllinie charakterisierten, dass beide siRNAs *off-target*-Effekte in den Zellen verursachten (persönliche Rücksprache mit Olga Müller, Universität Duisburg-Essen, Abteilung für Molekulare Zellbiologie). Ob der Phänotyp der siRhoA#6 auf die Depletion von RhoA zurückzuführen ist, kann daher nur durch Wiederholung der Versuche mit weiteren RhoA-spezifischen siRNAs geklärt werden. Es bleibt jedoch anzumerken, dass die RhoA-Depletion zwar möglicherweise in geringem Ausmaß die Stärke der HGF-Reaktion, nicht aber ihren prinzipiellen Verlauf veränderte. Dies passt zu den Ergebnissen einer anderen Studie, die ebenfalls nur eine geringe

Beeinträchtigung der HGF-Reaktion durch RhoA-Depletion zeigte: In Chemotaxis-Versuchen mit PC3-Zellen, bei denen eine Kombination von HGF und FBS als Lockstoff eingesetzt wurde, migrierten RhoA-depletierte Zellen ebenso effizient wie Zellen, die RhoA exprimierten (Vega *et al.*, 2011). Auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten scheint die Depletion von RhoA keinen substantiellen Einfluss auf die HGF-Reaktion von A549-Zellen zu haben. Die Behandlung mit dem Rho-Inhibitor C3 inhibiert die HGF-induzierte Motilität dagegen effizient (Takaishi *et al.*, 1994). Der Unterschied beider Ergebnisse liegt vermutlich darin begründet, dass C3 nicht nur RhoA, sondern auch die hochgradig homologen GTPasen RhoB und RhoC inhibiert (Chardin *et al.*, 1989; Hoshijima *et al.*, 1990). Es ist daher zu vermuten, dass entweder die siRNA-vermittelte Depletion von RhoA durch RhoB und/oder RhoC kompensiert wird, oder dass die HGF-induzierte Motilität selbst in Gegenwart von RhoA durch RhoB und/oder RhoC vermittelt wird.

5.1.6 Fazit: Weiterführende Untersuchungen sollten vor allem die Rolle der Degradation von RhoA in der HGF-Reaktion von A549-Zellen aufklären

In dieser Arbeit zeigten weder die Depletion von p190A, noch die von RhoA selbst einen deutlichen Effekt auf die HGF-Reaktion von A549-Zellen. Diese Ergebnisse sollten in zukünftigen Studien noch verifiziert werden, im Fall von p190A durch die Expression der beschriebenen dominant inaktiven Variante von p190A (Abschnitt 5.1.4), im Fall von RhoA durch die Wiederholung der Experimente mit anderen siRNAs (Abschnitt 5.1.5). In beiden Fällen legen jedoch die in den entsprechenden Abschnitten genannten Ergebnisse aus der Literatur die Vermutung nahe, dass auch weiterführende Experimente keine deutlicheren Phänotypen erwarten lassen. Die Degradation von RhoA stellt dagegen einen interessanten neuen Gesichtspunkt im Hinblick auf die HGF-induzierte Regulation von RhoA dar und sollte daher der vorrangige Aspekt in weiterführenden Untersuchungen sein. Zunächst sollte geklärt werden, ob die Degradation durch das Proteasom vorgenommen wird. Diese Frage könnte durch Anwendung des Proteasom-Inhibitors Lactacystin (Fenteany *et al.*, 1995) beantwortet werden. Sollte sich der Mechanismus der proteasomalen Degradation bestätigen, könnte als nächstes die Beteiligung der E3-Ligasen Smurf-1 und Cullin-3 in diesem Prozess geprüft werden. Proteasomale und insbesondere nicht-proteasomale Degradation von RhoA sind bislang nur wenig untersucht. Weiterführende Studien zu ihrer möglichen Rolle bei der Regulation der HGF-Reaktion von A549-Zellen könnten daher das bekannte Signalnetzwerk des multifunktionalen Signalproteins RhoA erweitern.

5.2 Charakterisierung des RhoA-Biosensors

5.2.1 Vergleich von PureDenoise-Makro und Gauss-Filter zur Verbesserung des SNR in mikroskopischen Bilddaten

Das Rauschen in mikroskopischen Bilddaten ist eines der grundlegenden Probleme, die bei der Fluoreszenzmikroskopie zu bewältigen sind, da es die Auswertbarkeit geringer Signalintensitäten beeinträchtigt (Wang, 2007). Manchmal erlaubt die Optimierung eines Experiments jedoch nur geringe Signalintensitäten: Beispielsweise greift geringe Expression eines fluoreszierenden Fusionsproteins weniger radikal in die endogenen Signalprozesse einer lebenden Zelle ein, so dass die unter solchen Bedingungen gesammelten Daten den natürlichen Zustand besser beschreiben als bei höherer Expression des Fusionsproteins: Aufgrund dieser Beobachtung beschränkten sich z.B. Kraynov *et al.* bei der Anwendung des von ihnen entwickelten Rac1-Biosensors auf schwach exprimierende Zellen (Kraynov *et al.*, 2000). Methoden, bei denen die Bildauswertung einen ratiometrischen Schritt enthält, sind für die Auswirkungen niedrigen SNRs jedoch besonders anfällig: Hier entsteht durch das Rauschen nicht nur eine starke Streuung der Ergebnisse um einen dennoch unveränderten Mittelwert, sondern sogar eine systematische Drift dieses Mittelwertes (Wang, 2007; Veranschaulichung in Abbildung A.1 im Anhang). Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten RhoA-Biosensoren wurden hauptsächlich nach der Methode der stimulierten Emission verwendet (Hodgson *et al.*, 2010). Diese erfordert ratiometrische Bildauswertung und ist demnach gegenüber niedrigem SNR empfindlich. Zwar weisen mehrere Publikationen auf die Wichtigkeit eines hohen SNR für solche Bildauswertungen hin und erörtern die Möglichkeit, dieses vor der Analyse durch verschiedene Methoden zu verbessern (Wang, 2007; Hodgson *et al.*, 2010). Konkrete Beschreibungen, für welche Mikroskop-Systeme mit niedrigem SNR zu rechnen ist und anhand welcher Kriterien der Anwender entscheiden kann, ob für die gesammelten Daten SNR-Verbesserung nötig ist, fehlen jedoch in der Literatur. Eine entsprechende Untersuchung wurde daher im Rahmen dieser Arbeit für das verwendete konfokale Laser-Raster-Mikroskop vorgenommen. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden ausgewählt, um das SNR der Bilddaten vor der Auswertung zu verbessern. Eine Methode war der Gauss-Filter der Bildauswertungs-Software ImageJ. Gauss-Filter sind seit langem etabliert, weil sie nur einen geringen Rechenaufwand erfordern (unter anderem diskutiert in Wang, 2007). Die Stärke des Glättungseffekts durch den Gauss-Filter ist variabel: Liegt dem Filter eine breite Gauss-Verteilung zugrunde, glättet er die Daten stark, mit einer schmalen Gauss-Verteilung ist der Effekt des Filters geringer. Die Stärke des Filters

kann dadurch an das SNR der zu glättenden Daten angepasst werden. Ein Nachteil des Gauss-Filters ist jedoch, dass er keine Interpretation der Bilddaten vornimmt. Daher werden reale Bilddetails nicht vor der Glättung geschützt, ihre Schärfe nimmt ab. Zufällige statistische Ansammlungen von Bildpixeln, die in die gleiche Richtung vom realen Wert abweichen, werden ebenfalls nicht erkannt. Der Gauss-Filter verstärkt diese, so dass Artefakte entstehen (Wang, 2007). Als zweite Methode zur SNR-Verbesserung wurde daher das PureDenoise-Makro verwendet, das für die Software ImageJ geschrieben wurde (Luisier *et al.*, 2011). Dieses ist zwar erheblich rechenintensiver, enthält aber dafür den Schritt der Bildinterpretation, der dem Gauss-Filter fehlt: Das PureDenoise-Makro führt eine Fourier-Transformation der zu glättenden Bilddaten durch und separiert anhand des Leistungsdichtespektrums Rauschen von realer Bildinformation. Luisier *et al.* geben an, dass reale Bilddetails dadurch erhalten bleiben und die Bildung von Artefakten vermieden wird. Das PureDenoise-Makro enthält ebenfalls die Möglichkeit, seine Stärke dem SNR der Bilddaten anzupassen: Er benötigt zur Abschätzung des Rauschens in einem Bild drei Rausch-Kenngrößen, den Verstärkungsfaktor des analog-zu-digital-Umsetzers (A), die Höhe des Hintergrundsignals (B) sowie die Standardabweichung des Hintergrundsignals (σ_d). Diese Kenngrößen können von außen manuell vorgegeben werden, oder das Makro extrahiert sie automatisch aus dem zu glättenden Bild selbst. Bevor in dieser Arbeit Gauss-Filter und PureDenoise-Makro verglichen werden konnten, musste daher zunächst diese automatische Rausch-Abschätzung von PureDenoise untersucht werden. Das wiederum erforderte eine manuelle Messung der Rausch-Kenngrößen, die in den zu glättenden Bilddaten zu erwarten waren.

5.2.1.1 Die Leistungsfähigkeit des PureDenoise-Makros beim Abschätzen der Rausch-Kenngrößen

Die Anwendung des PureDenoise-Makros auf fluoreszenz-mikroskopische Daten wurde bisher nicht in unabhängigen Untersuchungen gezeigt. Dementsprechend ist seine Leistungsfähigkeit, die Interpretierbarkeit fluoreszenz-mikroskopischer Daten zu verbessern, noch weitgehend uncharakterisiert. Eine solche Charakterisierung wurde daher als Teil dieser Arbeit vorgenommen. Dazu wurde zunächst untersucht, wie verlässlich die automatische Abschätzung der Rausch-Parameter durch das PureDenoise-Makro ist. Die manuelle Messung der Rausch-Kenngrößen erfolgte nach der von Wang vorgestellten Methode (Wang, 2007). Die Rausch-Kenngrößen, die automatisch durch PureDenoise geschätzt wurden, wurden mit den manuell gemessen verglichen. An der hohen Standardabweichung der Werte, die das

PureDenoise-Makro für die Kenngröße A geschätzt hatte, ist ersichtlich, dass der PureDenoise-Schätzwert dieser Kenngröße im Einzelfall recht ungenau sein kann. Die einzige tatsächlich große Abweichung zwischen automatischer und manueller Messung zeigte jedoch die Kenngröße σ_d , die die Mindest-Varianz eines Bildes angibt. Die automatisch gemessenen Werte sind hier 2,5 bis 3 mal so hoch wie die manuell gemessenen. Die manuelle Messung dieses Wertes erfolgte an Bildern ohne Anregung. Die automatische Messung dagegen erfolgte in den dunkelsten Regionen von Bildern, die mit Anregung aufgezeichnet worden waren; die gleichen Regionen verwendet PureDenoise auch zur automatischen Messung des Hintergrundsignals B (Luisier *et al.*, 2011). Daran, wie gut die automatisch und manuell gemessenen Werte für B übereinstimmen, wird deutlich, dass als Ursache für die erhöhte Varianz in diesen Regionen kein erhöhtes Signal in Frage kommt. Eine mögliche Erklärung könnte vielmehr im Rest des Bildes liegen: Die Helligkeit der Bilder, an denen σ_d manuell gemessen wurde, lag homogen auf dem Niveau des Hintergrundsignals. Das traf auf die Bilder, an denen PureDenoise die Rausch-Kenngrößen automatisch abschätzte, nicht zu. Möglicherweise stieg die Mindest-Varianz der untersuchten PMTs allein dadurch an, dass sie beim Abrastern des Gesichtsfeldes wenige Mikrosekunden vorher noch Signal detektiert hatten. In diesem Fall wäre es sogar denkbar, dass die durch PureDenoise automatisch abgeschätzten σ_d -Werte das Rauschen in mikroskopischen Bildern, die ja stets Regionen mit erhöhtem Signal enthalten, sogar exakter beschreiben als die manuell gemessenen. Im Folgenden wurden daher nicht nur Gauss-Filter und PureDenoise verglichen. Es wurde auch untersucht, wie stark die Ergebnisse des PureDenoise-Makros durch die Unterschiede zwischen manuell gemessenen und automatisch abgeschätzten Rausch-Kenngrößen beeinflusst wurden. Diese Untersuchung sollte dazu dienen, bei der Verwendung des PureDenoise-Makros in zukünftigen Studien zu entscheiden, ob auf die manuelle Messung der Rausch-Parameter des verwendeten Mikroskop-Systems verzichtet werden kann.

5.2.1.2 PureDenoise ist dem Gauss-Filter in seinen Auswirkungen auf die Helligkeit von Rohdaten- und Quotientenbildern überlegen

Die gemessene Helligkeit in mikroskopischen Bildern schwankt durch das Rauschen des Bildes um den realen Wert der Helligkeit. Schwankungen nach oben und nach unten sind dabei im statistischen Mittel betragsmäßig gleich. Methoden zur SNR-Verbesserung sollten daher diese Schwankungen verringern, ohne jedoch die mittlere Helligkeit der Daten zu verändern. Für die Helligkeit der Quotientenbilder ist ein anderer Effekt der SNR-Verbesserung wünschenswert: Ist in einer Division der Divisor durch Rauschen überlagert,

führt dies zu einer systematischen Drift des Quotienten zu höheren Werten (Wang, 2007; Veranschaulichung in Abbildung A.1 im Anhang). Diesem unerwünschten Effekt soll vorherige SNR-Verbesserung entgegenwirken. Das PureDenoise-Makro war dem Gauss-Filter insofern überlegen, als es wie gewünscht die Helligkeit der Quotientenbilder verringerte, ohne jedoch einen merklichen, unerwünschten Effekt auf die Helligkeit der Rohdaten zu zeigen. Der Gauss-Filter konnte dagegen, abhängig vom gewählten Radius, jeweils nur eines von beiden Kriterien erfüllen.

5.2.1.3 Der Skalierungsfaktor eines Quotientenbildes ist von der Helligkeit der Rohdaten abhängig; SNR-Verbesserung verringert diese Abhängigkeit

Zwei wichtige Einflüsse, die die Histogrammbreite eines Quotientenbildes bestimmen, sind sein SNR (Wang, 2007) sowie echte Helligkeitsunterschiede innerhalb des Bildes. Daraus folgt, dass die Histogrammbreite eines Bildes als Maß für seine Kontraststärke betrachtet werden könnte, allerdings nur dann, wenn der letztgenannte Einfluss den erstgenannten merklich überwiegt. Daher wurde untersucht, ob die Histogrammbreite der RhoA-Biosensor-Quotientenbilder als Maß für deren Heterogenität genutzt werden konnte und wie sich die verschiedenen Methoden der SNR-Verbesserung darauf auswirkten. Als Maß für die Histogrammbreite wurde der Skalierungsfaktor betrachtet. Die Analyse von Quotientenbildern, die ohne vorherige SNR-Verbesserung berechnet wurden, zeigte, dass ihre Skalierungsfaktoren hauptsächlich durch das SNR der Rohdaten bestimmt wurden: Sie waren umso größer, je dunkler die Rohdaten waren. Außerdem waren die Skalierungsfaktoren von CFP2/CFP-Quotientenbildern zumeist größer als die der zugehörigen FRET/CFP-Quotientenbilder, obgleich die CFP2/CFP-Quotientenbilder keine biologisch relevante Information beinhalten, die das Histogramm der Bilder verbreitern könnte. Diese Beobachtung erklärt sich daraus, dass das Rauschen im CFP-Kanal stärker war als das im FRET-Kanal: Die manuelle Messung der Rausch-Kenngrößen des verwendeten Laser-Raster-Mikroskops hatte bereits gezeigt, dass Mindest-Varianz σ_d und Verstärkungsfaktor A für PMT1, der für die Aufzeichnung des CFP-Kanals verwendet wurde, größer waren als für PMT3, der für die Aufzeichnung des FRET-Kanals verwendet wurde (vgl. Tabelle 4.1). Demzufolge wiesen die CFP-Bilder höheres Rauschen bzw. ein geringeres SNR auf als die FRET-Bilder. Für unmodifizierte Daten war der Einfluss des SNR auf die Histogramm-Breite also so stark, dass ein kontrastarmes Quotientenbild, welches aus zwei CFP-Bildern mit geringem SNR berechnet wurde, ein breiteres Histogramm aufwies als ein kontrastreicheres Quotientenbild, zu dessen Berechnung ein FRET-Bild mit etwas höherem SNR genutzt

wurde. Diese Feststellung verdeutlicht die Wichtigkeit der SNR-Verbesserung von fluoreszenz-mikroskopischen Daten, die mit vergleichbaren technischen Mitteln aufgenommen werden, und liefert gleichzeitig ein Kriterium, anhand dessen die Notwendigkeit der SNR-Verbesserung beurteilt werden kann.

Das PureDenoise-Makro konnte die Abhängigkeit der Skalierungsfaktoren von der Helligkeit der Rohdaten stark verringern. Außerdem konnte es den Einfluss des SNR auf die Histogrammbreiten von Quotientenbildern so weit verringern, dass kontraststarke FRET/CFP-Quotientenbilder nun größere Skalierungsfaktoren hatten als ihre zugehörigen kontrastschwachen CFP2/CFP-Quotientenbilder. Der Gauss-Filter konnte ebenfalls beide Effekte erzielen, jedoch nur dann, wenn sein Radius groß genug gewählt wurde. Durch SNR-Verbesserung wurde die Unterscheidung von Zellpopulationen anhand des Verhältnisses ihrer FRET/CFP- und CFP2/CFP-Skalierungsfaktoren ermöglicht: Für den funktionellen RhoA-Biosensor, dessen FRET/CFP-Quotientenbilder kontrastreich waren, stiegen die FRET/CFP-Skalierungsfaktoren merklich über die CFP2/CFP-Skalierungsfaktoren an. Für den RBD-trunkierten RhoA-Biosensor mit seinen kontrastarmen FRET/CFP-Quotientenbildern fiel dieser Unterschied signifikant geringer aus (Abbildung 4.18). Feinere Unterscheidungen, wie z.B. von HGF-stimulierten und unstimulierten MDCK-Zellen, die dasselbe RhoA-Biosensor-Konstrukt exprimierten, waren jedoch anhand der Skalierungsfaktoren auch nach SNR-Verbesserung nicht möglich. Somit zeigt diese Untersuchung neben der Leistungsfähigkeit der SNR-Verbesserung auch ihre Grenzen auf. Zudem konnte keine der angewandten SNR-Verbesserungen die Abhängigkeit der Skalierungsfaktoren von der Helligkeit der Rohdaten völlig aufheben (Abbildung 4.17 und nicht gezeigt). Auch nach SNR-Verbesserung kann die Histogramm-Breite eines Quotientenbildes demnach nicht als quantitatives Maß für seine Kontraststärke betrachtet werden.

5.2.1.4 Fazit: Angemessene SNR-Verbesserung ist mit dem PureDenoise-Makro einfacher zu erzielen als mit einem Gauss-Filter

Die Kontraste in den FRET/CFP-Quotientenbildern waren durch die SNR-Verbesserung leichter intuitiv zu erkennen. Hinsichtlich der Entstehung von Artefakten durch die SNR-Verbesserung konnte jedoch, zumindest durch den rein optischen Vergleich, kein Unterschied zwischen der Leistung des PureDenoise-Makros und des Gauss-Filters festgestellt werden: Mit beiden Methoden wirkten die Quotientenbilder körnig.

Die Unterschiede zwischen manuell gemessenen und automatisch abgeschätzten Rausch-Kenngrößen (Abschnitt 5.2.1.1) wirken sich auf die Ergebnisse des PureDenoise-Makros

nahezu nicht aus. FRET/CFP-Quotientenbilder, die nach Anwendung von Gauss-Filter und PureDenoise-Makro berechnet wurden, unterschieden sich dagegen an den Zellrändern (Abbildung 4.19 unten rechts). Dieser Unterschied belegt, dass dort die reale Bildinformation durch den Gauss-Filter beeinträchtigt wurde, während das PureDenoise-Makro diese durch die Interpretation des Leistungsdichtespektrums schützt (Luisier *et al.*, 2011).

Die Einstellungen, die für die Arbeit mit dem RhoA-Biosensor am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop gewählt wurden, waren sorgfältig auf gute Bildqualität hin optimiert. Dennoch zeigte die Analyse der unmodifizierten Daten, dass die Interpretierbarkeit der Ergebnisse durch schlechtes SNR beeinträchtigt war. Dies konnte daran beurteilt werden, dass die Histogramm-Breiten der berechneten Quotientenbilder stark von der Helligkeit der Rohdaten abhängig waren. Diese Abhängigkeit wurde durch rechnerische SNR-Verbesserung der Rohdaten stark verringert. Für die hier gegebene Bildqualität war der Vorteil des PureDenoise-Makros gegenüber dem Gauss-Filter mit optimiertem Radius zwar erkennbar, jedoch sehr gering gegenüber dem viel höheren Rechenaufwand. Allerdings gab es deutliche Vorteile gegenüber den anderen, stärkeren oder schwächeren Gauss-Filtern. Der Gauss-Filter ist daher dem PureDenoise-Makro nur dann ebenbürtig, wenn sein optimaler Radius bekannt ist. Dieser ist vom SNR der zu glättenden Daten abhängig, seine Bestimmung erfordert daher zusätzliche Arbeit, wenn er nicht empirisch bleiben soll. Für das PureDenoise-Makro dagegen wurde bestätigt, dass seine Anwendung mit automatischer Abschätzung klar definierter Rausch-Kenngrößen ebenso gute Ergebnisse liefert wie die Anwendung des Makros mit manuell gemessenen Rausch-Kenngrößen (Luisier *et al.*, 2011). Der dazu nötige zusätzliche Rechenaufwand ist sehr gering. Für das PureDenoise-Makro besteht also im Gegensatz zum Gauss-Filter nicht die Gefahr, Daten zu stark oder aber nicht stark genug zu glätten. Für die weiteren ratiometrischen Arbeiten mit dem RhoA-Biosensor in dieser Arbeit wurde deswegen das PureDenoise-Makro verwendet.

Es gibt andere Anwendungen, für die generell Bilddaten mit schlechterer SNR zu erwarten sind: Für fluoreszenz-mikroskopische Filme lebender Zellen muss die Lichtbelastung, der die Zellen pro Einzelaufnahme ausgesetzt werden, reduziert werden (Hodgson *et al.*, 2010). Gezielt geringe Expression fluoreszierender Fusionsproteine greift zwar weniger in den endogenen Stoffwechsel lebender Zellen ein (Kraynov *et al.*, 2000), führt jedoch auch zu einer geringeren Gesamtfluoreszenz der Probe. Dies sind nur zwei Beispiele für Anwendungen, bei denen möglicherweise ein stärkerer Gauss-Filter gewählt werden müsste, der dadurch auch stärkere Nachteile mit sich brächte. Dann wäre selbst ein Gauss-Filter mit optimierter Stärke dem PureDenoise-Makro möglicherweise nicht mehr gleichwertig.

5.2.2 Mechanistische Untersuchungen am RhoA-Biosensor

5.2.2.1 Untersuchungen zur Überprüfung des postulierten RhoA-Biosensor-Mechanismus

Der publizierte Mechanismus des RhoA-Biosensors von Pertz *et al.* besagt, dass die Aktivierung des Biosensor-RhoAs eine intramolekulare Bindung zur Biosensor-RBD induziert (Pertz *et al.*, 2006). Eine solche intramolekulare Bindung konnte in dieser Arbeit durch Affinitäts-Pulldowns bestätigt werden: RhoA-Biosensor-Konstrukte, die eine RBD enthielten, banden mit geringerer Effizienz an RBD-Sepharose als Konstrukte, denen die RBD fehlte (Abbildung 4.27 C). Pertz *et al.* postulierten, dass die Konformationsänderung des Biosensors, die durch die intramolekulare RBD-Bindung induziert wird, den Abstand zwischen CFP und YFP verringert und dass dadurch die FRET-Effizienz zwischen den Fluorophoren verstärkt wird. Wird das FRET-Bild einer RhoA-Biosensor-exprimierenden Zelle durch das zugehörige CFP-Bild geteilt, sollte daher ein Quotientenbild entstehen, in welchem Regionen hoher RhoA-Aktivität heller erscheinen als Regionen geringer RhoA-Aktivität (Pertz *et al.*, 2006). Der RhoA-Biosensor enthält FRET-Donor und -Akzeptor in einem einzigen Fusionsprotein. Daher werden Arbeiten mit dem Biosensor unter der Annahme durchgeführt, dass die Stöchiometrie beider Fluorophore an jeder Stelle in der Zelle 1 ist. Eine Konsequenz dieser Annahme ist, dass auf die Quantifizierung der spektralen Verunreinigung der Kanäle verzichtet wird. Derselben Logik folgend, sollten auch FRET/CFP-Quotientenbilder unterschiedlicher Zellen derselben Population bezüglich ihrer mittleren Helligkeit ähnlich sein. Tatsächlich wurde jedoch festgestellt, dass die FRET/CFP-Helligkeiten innerhalb einer Zellpopulation so variabel sind, dass dadurch sogar die Unterscheidbarkeit verschiedener Zellpopulationen erschwert wird (Abbildung 4.20 A): Der Q63L-Biosensor sollte eine höhere Aktivität aufweisen als der WT-Biosensor, da die Mutation Q63L in RhoA einen konstitutiv aktiven Zustand des Proteins hervorruft (Mayer *et al.*, 1999; Longenecker *et al.*, 2003). Dieser lässt sich unter anderem durch verstärkte Bindung des mutierten RhoAs an RBD-Sepharose nachweisen (Soh und Low, 2008). Mittels Aktivitäts-Pulldown wurde die höhere Aktivität des Q63L-Biosensors im Vergleich zu der des WT-Biosensors bestätigt (Abbildung 4.27 B). Dennoch waren individuelle FRET/CFP-Quotientenbilder des Q63L-Biosensors teilweise sogar dunkler als die des WT-Biosensors (Abbildung 4.20). Die erste Vermutung war, dass die absolute Menge an RhoA-Biosensor-Molekülen in der Zelle die Helligkeit ihres FRET/CFP-Quotientenbildes beeinflusst. Für CFP wurde bereits demonstriert, dass seine Fluoreszenz bei hohen Konzentrationen nicht linear mit

der Konzentration ansteigt; stattdessen wird der relative Zuwachs an Fluoreszenz mit steigender Konzentration des Fluorophors immer geringer (Grailhe *et al.*, 2006). In Abbildung 4.20 B ist jedoch kein Zusammenhang zwischen der Helligkeit des CFP-Bildes und der des resultierenden FRET/CFP-Quotientenbildes erkennbar. Wenn sich jedoch die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder von Zelle zu Zelle so stark unterscheidet, und das sogar im Falle des nicht regulierbaren Q63L-Biosensors, muss in Frage gestellt werden, ob die Stöchiometrie von CFP und YFP tatsächlich in allen Zellen dieselbe ist. Wenn dies jedoch in Zweifel gezogen werden muss, muss gleichzeitig die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass auch innerhalb einer Zelle die Stöchiometrie von CFP und YFP Schwankungen unterworfen sein könnte. Die in den folgenden Unterabschnitten diskutierten Experimente wurden daher mit dem Ziel durchgeführt, zu überprüfen, ob die Stöchiometrie von CFP und YFP innerhalb einer Zelle konstant ist und ob die Signalverteilungen in den FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors durch dessen Aktivitätsstatus bestimmt werden.

5.2.2.1.1 Differentieller FRET ist nicht der Mechanismus des RhoA-Biosensors

Falls die Signalunterschiede, die in FRET/CFP-Quotientenbildern beobachtet wurden, auf differentiellen FRET der beiden Fluorophore im Biosensor-Molekül zurückzuführen sind, wären sie im Wesentlichen durch die additive Wirkung zweier verschiedener Effekte entstanden (Förster, 1948): Erstens wäre in Regionen mit erhöhtem FRET die im FRET-Kanal gemessene Emission des YFP erhöht. Zweitens wäre in denselben Regionen die im CFP-Kanal gemessene Emission des CFP verringert, da die durch FRET übertragene Energie nicht als Fluoreszenz durch CFP selbst abgestrahlt werden kann. In den YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbildern würde jeweils nur einer der beschriebenen Effekte wirken: Im YFP/CFP-Quotientenbild könnte nur die verringerte CFP-Emission Signalunterschiede verursachen, im FRET/YFP-Quotientenbild nur die erhöhte Emission, die im FRET-Kanal gemessen wird. Beide Quotientenbilder sollten daher eine ähnliche Helligkeitsverteilung aufweisen wie das FRET/CFP-Quotientenbild, ihre Kontraste sollten jedoch schwächer sein. Das tatsächliche Aussehen von YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbildern entsprach jedoch nicht dieser Erwartung: YFP/CFP-Quotientenbilder sahen zwar den FRET/CFP-Quotientenbildern ähnlich (Abbildung 4.21 A), jedoch waren ihre Kontraste nicht schwächer, sondern sogar stärker (Abbildung 4.21 B). FRET/YFP-Quotientenbilder dagegen hatten keine Ähnlichkeit mit FRET/CFP-Quotientenbildern: Ihr Signal war nahezu homogen (Abbildung 4.21 A). Das tatsächliche Aussehen von YFP/CFP- und FRET/YFP-Quotientenbildern lässt darauf schließen, dass die Stöchiometrie von YFP- und CFP oder ihre Absorptions- und Emissions-

Eigenschaften in der Zelle nicht wie postuliert (Pertz *et al.*, 2006) homogen ist. Die Ergebnisse aus den FLIM-Messungen deuten zwar darauf hin, dass in den dynamischen Membranausstülpungen RhoA-Biosensor-exprimierender Zellen mehr FRET stattfindet als im Zellkörper (Abbildung 4.22 A). Da die FRET/YFP-Quotientenbilder jedoch nicht das oben beschriebene Erscheinungsbild zeigen, das als Resultat variabler FRET-Effizienz zu erwarten wäre, scheint der Effekt der variablen FRET-Effizienz zu gering zu sein, um in ratiometrischen Messungen neben dem ungleichmäßigen Fluoreszenzverhältnis der beiden Fluorophore beobachtbar zu sein. FRET/CFP-Quotientenbilder des Raichu-RhoA-Biosensors (Abbildung 4.23) sahen ähnlich aus wie die des WT-Biosensors von Pertz *et al.* (Abbildung 4.21). Die Tatsache, dass FRET/YFP-Quotientenbilder des Raichu-RhoA-Biosensors ebenfalls erhöhtes Signal in Membranausstülpungen aufwiesen, deutet darauf hin, dass Signalunterschiede in FRET/CFP-Quotientenbildern des Raichu-RhoA-Biosensors tatsächlich wie postuliert durch differentiellen FRET verursacht wurden (Yoshizaki *et al.*, 2003). Die Membranausstülpungen könnten demnach tatsächlich erhöhte RhoA-Aktivität gegenüber dem Zellkörper aufweisen. Jedoch waren die Daten des Raichu-RhoA-Biosensors nur eingeschränkt interpretierbar, weil insbesondere die CFP-Bilder von unregelmäßigem Signal überlagert waren. Dieses Signal stammte vermutlich von Biosensor-Bruchstücken, die von sterbenden Zellen freigesetzt wurden. Der Raichu-RhoA-Biosensor wurde daher nicht für weitere Arbeiten verwendet. Der Vergleich der ratiometrischen Messungen (Abbildung 4.21) mit den TIRF-Experimenten (Abbildung 4.33 B) zeigt, dass jene Regionen der Zelle, die erhöhtes Signal in den FRET/CFP-Quotientenbildern zeigen, auch die Regionen sind, in denen der WT-Biosensor bevorzugt an die Membran bindet. Wie bereits erwähnt, steigt in MDCK-Zellen die RhoA-Aktivität infolge HGF-Stimulation an (Zondag *et al.*, 2000; Cozzolino *et al.*, 2003; Miao *et al.*, 2003). HGF-Behandlung ändert jedoch auch die bevorzugte Lokalisation von RhoA in MDCK-Zellen: Während es in unstimulierten Zellen im Wesentlichen cytosolisch vorliegt, ist es in HGF-stimulierten Zellen hauptsächlich in den dynamischen Membranausstülpungen lokalisiert (Takaishi *et al.*, 1995). Diese Parallelität von Aktivierung und Translokation zur Membran hin lässt vermuten, dass es tatsächlich das aktive RhoA ist, welches an die Membran bindet. Einen weiteren Hinweis darauf lieferten die TIRF-Messungen mit dem mCherry-RBD-Konstrukt, das ebenfalls die dynamischen Membranausstülpungen zur Bindung bevorzugte (Abbildung 4.33 B): Bereits der erste entwickelte Cdc42-Aktivitäts-Biosensor basierte auf der Annahme, dass die Lokalisation einer GBD auch die Lokalisation der aktiven Form der GTPase anzeigt (Cannon *et al.*, 2001). Für die Detektion der aktiven Form von RhoA wurde dieses Prinzip ebenfalls bereits

verwendet (Nakaya *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008). Der Vergleich mit dem Raichu-RhoA-Biosensor, der Lokalisation von RhoA-Biosensor und mCherry-RBD an der Zellmembran sowie früheren Erkenntnissen aus der Literatur deutet also darauf hin, dass der RhoA-Biosensor die Regionen erhöhter RhoA-Aktivität tatsächlich korrekt anzeigt. Das Erscheinungsbild der FRET/YFP-Quotientenbilder und die Ergebnisse der FLIM-Messungen legen jedoch nahe, dass dies im Wesentlichen nicht nach dem postulierten FRET-basierten Mechanismus geschieht.

5.2.2.1.2 Die Biosensor-RBD ist notwendig für die systematischen Signalverteilungen in den FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors

Fehlt dem RhoA-Biosensor die RBD, kann die Aktivierung des Biosensor-RhoAs keine intramolekulare Bindung im Biosensor vermitteln. Fehlen ihm sowohl RBD als auch RhoA, enthält er keine Komponente mehr, die mit der Regulation von RhoA im Zusammenhang steht. Wenn die beobachteten Muster in FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbildern des funktionellen RhoA-Biosensors mit dem Aktivitätsstatus des Biosensor-RhoAs in Zusammenhang stehen, dann dürften Quotientenbilder dieser beiden trunkierten Biosensor-Konstrukte demnach keine vergleichbaren Muster aufweisen. Diese Erwartung wurde durch die Experimente mit den trunkierten Konstrukten bestätigt (Abbildung 4.24 A). Verbleibende schwache Muster in den Quotientenbildern des Δ RBD-Biosensors könnten ebenfalls mit dem Aktivitätsstatus von RhoA in Zusammenhang stehen: Dieses Konstrukt enthält noch ein regulierbares RhoA. Dessen aktive Form könnte, da kein intramolekularer Bindungspartner zur Verfügung steht, endogene Effektoren binden. Auch eine solche intermolekulare Bindung könnte die Fluoreszenz von CFP und/oder YFP beeinflussen.

5.2.2.1.3 Die Signalverteilung in FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors wird nicht unmittelbar durch den RhoA-Aktivitätsstatus bestimmt

Die Mutation Q63L in RhoA eliminiert sein GTP-Hydrolyse-Potential (Mayer *et al.*, 1999; Longenecker *et al.*, 2003), es liegt daher konstitutiv in der GTP-gebundenen, aktiven Form vor. RhoA mit der Mutation T19N ist dagegen dominant inaktiv: Es bindet stark an verschiedene RhoGEFs (Strassheim *et al.*, 2000; Baisamy *et al.*, 2009), jedoch in RhoA-Aktivitäts-Pulldowns nicht an RBD (Veettil *et al.*, 2006; Soh und Low, 2008). In einem RhoA-Biosensor-Konstrukt, dessen RhoA-Anteil die Q63L-Mutation trägt, müsste die intramolekulare Bindung zur Biosensor-RBD daher permanent sein. In einem RhoA-

Biosensor-Konstrukt, dessen RhoA-Anteil die T19N-Mutation trägt, dürfte sie dagegen gar nicht ausgebildet werden. Die Hypothese, zu deren Überprüfung die Experimente mit den Q63L- und T19N-Biosensoren durchgeführt wurden, lautete daher, dass die FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbilder beider Konstrukte ein homogenes Signal haben würden. Das Gegenteil war jedoch der Fall: Sie zeigten die gleichen Signalverteilungen wie der funktionelle RhoA-Biosensor (Abbildung 4.25 A). Außerdem zeigte der Q63L-Biosensor in FLIM-Experimenten den gleichen, geringfügig verstärkten FRET wie der WT-Biosensor (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die typischen Signaländerungen in den FRET/CFP-Quotientenbildern unabhängig von einer Aktivitätsänderung des Biosensor-RhoAs und unabhängig von der Konformation des Biosensors auftreten können. In einem anderen Punkt entsprachen die Ergebnisse der Experimente mit Q63L- und T19N-Biosensor dennoch den Erwartungen: Die Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder waren untereinander und von denen des WT-Biosensors signifikant unterscheidbar, und auch die Direktionalität war wie erwartet: Der Q63L-Biosensor hatte die hellsten FRET/CFP-Quotientenbilder, die des T19N-Biosensors waren die dunkelsten (Abbildung 4.25 B). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Angaben von Pertz *et al.*, die vergleichbare Ergebnisse in einem fluorometrischen Experiment erhalten hatten (Pertz *et al.*, 2006). Die Ergebnisse stimmen sogar dahingehend überein, dass der Unterschied zwischen WT- und Q63L-Biosensor geringer ist als zwischen WT- und T19N-Biosensor. Als naheliegendste Erklärung für die unterschiedlichen FRET/CFP-Quotientenbild-Helligkeiten wurde zunächst angenommen, dass zumindest das durchschnittliche Signal des Biosensors durch seine Konformation bestimmt wird. Die folgenden Experimente mit den RBD-trunkierten Q63L- und T19N-Biosensoren (Abschnitt 4.2.2.7) wurden zur Überprüfung dieser Hypothese durchgeführt. In anderen Experimenten wurde eingegrenzt, welche weiteren Faktoren das Erscheinungsbild der FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbilder des RhoA-Biosensors beeinflussen (Abschnitte 4.2.2.9, 4.2.2.10, 4.2.2.11 und 4.2.2.13).

5.2.2.1.4 Der T19N-Biosensor ist als Negativkontrolle für den RhoA-Biosensor ungeeignet

Enthält der RhoA-Biosensor keine RBD, sollten seine Konformation und somit auch sein FRET/CFP-Quotientensignal unabhängig vom Aktivitätsstatus des Biosensor-RhoAs sein. Dies traf zwar auf die WT- und Q63L-Biosensoren zu, nicht jedoch auf den T19N-Biosensor: Trunkierung der RBD vom T19N-Biosensor eliminierte weder die Signalverteilungen in den FRET/CFP-Quotientenbildern (Abbildung 4.26 A), noch deren Helligkeitsunterschied im

Vergleich zu den WT- und Q63L-Biosensoren (Abbildung 4.26 B). Das Signal des Δ RBD-T19N-Biosensors unterliegt also anderen Einflüssen als das der Δ RBD- und Δ RBD-Q63L-Biosensoren. Es wurde nicht genauer untersucht, um welche Einflüsse es sich handelt. Die Signalverteilung in den FRET/CFP-Quotientenbildern zeigt jedoch, dass sie innerhalb der Zelle unterschiedlich stark wirken. Die bekannten Veränderungen, die die Mutation T19N in RhoA auslöst, sind die folgenden: Seine Bindung an mindestens ein GEF (SmgGDS) ist gegenüber der des WT-RhoAs verstärkt (Strassheim *et al.*, 2000), die Bindung an die Effektor-Domäne RBD wird dagegen durch die Mutation unterbunden (Veettil *et al.*, 2006; Soh und Low, 2008), ebenso wie die Bindung an RhoGDI (Strassheim *et al.*, 2000; Michaelson *et al.*, 2001; Miyazaki *et al.*, 2002). T19N-RhoA liegt in der Zelle zu größerem Anteil unprenyliert vor als WT-RhoA (Berg *et al.*, 2010). Homologe Mutationen in H-Ras und Rac1 zeigen im Vergleich zu den entsprechenden WT-Formen eine Veränderung der Nukleotid-Bindung zugunsten von GDP (Feig und Cooper, 1988; Ridley *et al.*, 1992), daher kann eine ähnliche Präferenz auch für T19N-RhoA erwartet werden. Für T19N-RhoA wurde indes gezeigt, dass es insgesamt verstärkt in Nukleotid-freier Form vorliegt (Strassheim *et al.*, 2000). Pertz *et al.* zeigten dies auch für den T19N-Biosensor selbst (Pertz *et al.*, 2006). Anhand der Struktur von S17N-H-Ras kann dasselbe Phänomen wiederum auch für homologe Mutationen in verwandten GTPasen vermutet werden (Nassar *et al.*, 2010). T19N-RhoA hydrolysiert GTP schneller als WT-RhoA: Die Rate der Hydrolyse wird durch die Mutation ungefähr um den Faktor 10 erhöht (Miyazaki *et al.*, 2002). Zwischen einigen der Unterschiede bestehen vermutlich kausale Zusammenhänge, so z.B. zwischen verringerter Prenylierung und verringerter RhoGDI-Bindung (Tnimmov *et al.*, 2012), oder zwischen verringerter Nukleotid-Bindung und verstärkter GEF-Bindung (Hart *et al.*, 1994). Es ist denkbar, dass T19N-Biosensor-Moleküle mit hohem bzw. niedrigem FRET/CFP-Quotientensignal sich gleich in mehreren Punkten voneinander unterscheiden, so z.B. im Vorhandensein von Nukleotid-Bindung, Bindung an ein GEF und Prenylierung. So könnten mehrere Einflüsse additiv auf das FRET/CFP-Quotientensignal wirken. Der letztgenannte Unterschied, das Vorhandensein der C-terminalen Prenylierung und somit die Möglichkeit der Membranbindung, würde auch erklären, warum beide Spezies von T19N-Biosensor-Molekülen offenbar zumindest teilweise räumlich voneinander separiert sind. Es muss daher auch in Frage gestellt werden, ob der T19N-Biosensor überhaupt ein gutes Referenz-Konstrukt für den WT-Biosensor darstellt: Den vorliegenden Ergebnissen zufolge gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, dass die FRET/CFP-Quotientenbilder des WT-Biosensors bei vollständiger Inaktivierung des RhoAs ebenso dunkel wären, wie die des T19N-Biosensors es sind. Für den Q63L-Biosensor warfen

die Experimente keine entsprechenden Bedenken auf. Es wurde daher angenommen, dass die Helligkeit seiner FRET/CFP-Quotientenbilder jene Helligkeit angibt, die FRET/CFP-Quotientenbilder des WT-Biosensors hätten, wenn dieser vollständig aktiviert wäre. Daher wurde auch in allen folgenden Experimenten zur Überprüfung alternativer Einflüsse auf den RhoA-Biosensor eine entsprechende Variante des Q63L-Biosensors mitgeführt, jedoch nicht immer eine entsprechende Variante des T19N-Biosensors.

5.2.2.2 Untersuchungen zur Überprüfung alternativer Einflüsse auf den RhoA-Biosensor

5.2.2.2.1 Die FRET/CFP-Quotientenbilder des RhoA-Biosensors werden nicht durch intrazelluläre Variationen der ATP-Konzentration beeinflusst

Willemse *et al.* berichteten, dass das FRET/Donor-Signalverhältnis in FRET-Proben, die als Donor CFP tragen, von der ATP-Konzentration abhängig ist (Willemse *et al.*, 2007). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die Gegenwart von ATP die Fluoreszenz-Lebensdauer von CFP verringert, wohingegen das Fluorophor cerulean gegenüber ATP insensitive ist (Borst *et al.*, 2010). cerulean wurde durch gezielte Mutagenese aus CFP konstruiert, unterscheidet sich vom CFP des RhoA-Biosensors nur in drei Aminosäuren (S72A/Y145A/H148D) und eignet sich als FRET-Donor für YFP, da seine Absorptions- und Emissionsspektren denen von CFP sehr ähnlich sind (Rizzo *et al.*, 2004). ATP ist ein häufiges Molekül in der Zelle und könnte durchaus in verschiedenen Zellkompartimenten in unterschiedlicher Konzentration vorliegen. Der RhoA-Biosensor könnte z.B. im Cytosol und an der Membran unterschiedlichen ATP-Konzentrationen ausgesetzt sein: Für cAMP wurde ein solcher Konzentrationsunterschied bereits beobachtet (Karpen und Rich, 2004) und für ATP anhand eines Modells errechnet (Alekseev *et al.*, 2012). ATP kam daher als ein möglicher Faktor in Frage, der die Stöchiometrie von CFP-Fluoreszenz des RhoA-Biosensors ortsabhängig verändern könnte. Mit den ratiometrischen Messungen der cerulean-tragenden RhoA-Biosensor-Varianten wurde daher geprüft, ob die Muster in den FRET/CFP-Quotientenbildern des Q63L-Biosensors (und womöglich auch in denen des WT-Biosensors) durch intrazelluläre Variationen in der ATP-Konzentration verursacht wurden: In diesem Fall wäre die Signalverteilung in den FRET/CFP-Quotientenbildern der cerulean-tragenden Konstrukte homogener gewesen. Stattdessen belegte jedoch die unveränderte Signalverteilung, dass die Muster in den FRET/CFP-Quotientenbildern nicht durch ATP hervorgerufen wurden.

Allerdings hat cerulean gegenüber CFP die weiteren Vorteile erhöhter Photostabilität und Helligkeit (Rizzo *et al.*, 2004). Letztere Eigenschaft machte sich bei den cerulean-tragenden RhoA-Biosensor-Konstrukten bemerkbar: Ihre FRET/Donor-Quotientenbilder waren signifikant dunkler als die ihrer CFP-tragenden Gegenstücke, da das CFP- bzw. cerulean-Signal bei deren Berechnung im Nenner steht. Diese Veränderung beeinflusste nicht die signifikanten Unterschiede zwischen WT- und Q63L- bzw. Δ RBD-Biosensor, hatte also keinen nachteiligen Effekt auf die Interpretierbarkeit der Daten (vgl. Abbildung 4.28 mit Abbildungen 4.24 B bzw. 4.25 B). cerulean-tragende RhoA-Biosensor-Konstrukte haben also gegenüber ihren CFP-tragenden Gegenstücken den Vorteil, die Aufzeichnung von Donorbildern mit höherer Helligkeit und somit besserem SNR zu ermöglichen.

5.2.2.2 Die Biosensor-RBD schützt den RhoA-Biosensor vor Extraktion aus der Plasmamembran durch RhoGDI und verhindert die übermäßige Beeinträchtigung endogener Signalprozesse

RhoA kann am Serin an Position 188 phosphoryliert werden (Lang *et al.*, 1996). Durch die Phosphorylierung des Biosensor-RhoAs ist kein direkter Einfluss auf die intramolekulare Bindung an RBD zu erwarten, da die Phosphorylierung von RhoA die Bindung an Rhotekin *in vitro* nicht verändert (Nusser *et al.*, 2006). Stattdessen ist verstärkte Bindung an RhoGDI ein Haupteffekt der Phosphorylierung (Lang *et al.*, 1996; Forget *et al.*, 2002; Ellerbroek *et al.*, 2003; Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Diese ist vermutlich auch der Grund, weshalb die Phosphorylierung *in vivo* deaktivierend auf RhoA wirkt: Exogenes RhoA, in welchem die Phosphorylierung durch die Mutation S188E imitiert wird, liegt weniger in der aktiven, GTP-gebundenen Form vor als vergleichbare Konstrukte, die durch die Mutation S188A unphosphorylierbar sind (Ellerbroek *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung des RhoA-Biosensors könnte demnach sowohl seine Interaktion mit endogenen Bindungspartnern, als auch seine Aktivität verändern. Jedoch bewirkten weder die Mutation S188A, noch die Mutation S188E im WT- oder Q63L-Biosensor eine Veränderung der Ergebnisse (Abbildung 4.29). Durch Einführung der Mutation R68E in die WT-, Q63L- und T19N-Biosensoren wurde geprüft, ob der Effekt der Phosphorylierungs-Mutanten auf die RhoGDI-Interaktion lediglich zu schwach war, um die Ergebnisse der Biosensor-Konstrukte messbar zu verändern: Die Kristallstruktur des RhoGDI-RhoA-GDP-Komplexes identifizierte R68 in RhoA als eine der Aminosäuren, die vermutlich an der Interaktion mit RhoGDI beteiligt sind (Longenecker *et al.*, 1999). Die Mutation R68E in RhoA wird daher verwendet, um die Bindung an RhoGDI zu unterbinden (Ho *et al.*, 2008; Tkachenko *et al.*, 2011). Auch diese

Mutation zeigte jedoch keinen Effekt auf die RBD-tragenden RhoA-Biosensoren (Abbildung 4.30). Einen Hinweis auf den möglichen Grund für den fehlenden Effekt lieferten schließlich Experimente mit den Δ RBD- und Δ RBD-Q63L-Biosensoren, die ebenfalls die Mutation R68E trugen: Sowohl Aufnahmen des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops, als auch TIRF-Aufnahmen zeigten, dass der Δ RBD-Biosensor weniger stark in dynamischen Membranausstülpungen akkumulierte als sein RBD-tragendes Gegenstück (Abbildungen 4.24 A und 4.33 B). Ebenfalls mit beiden Methoden wurde gezeigt, dass dieser Effekt durch Einführung der R68E-Mutation aufgehoben wurde (Abbildungen 4.31 A und 4.33 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Δ RBD-Biosensor stärker durch RhoGDI aus der Membran extrahiert wird als der RBD-tragende WT-Biosensor. Die entropisch begünstigte intramolekulare Bindung an die Biosensor-RBD scheint die intermolekulare Bindung des WT-Biosensors an endogenes RhoGDI demnach zu verringern. Der RhoA-Biosensor, welcher die RBD enthält, bindet demnach vermutlich auch weniger an endogenes RhoGDI als das endogene RhoA. Dies ist ein Beispiel dafür, wie die Regulation des Biosensor-RhoAs sich von der des endogenen RhoAs unterscheiden könnte. Da verringerte Interaktion mit RhoGDI aktivierend auf RhoA wirkt (Boulter *et al.*, 2010), ist das Biosensor-RhoA vermutlich insgesamt stärker aktiviert als das endogene RhoA. Dies würde auch den geringen Unterschied zwischen den Ergebnissen von WT- und Q63L-Biosensor erklären, der sowohl in dieser Arbeit, als auch von Pertz *et al.* beschrieben wurde (Pertz *et al.*, 2006). Eine solche unterschiedliche Aktivierung von Biosensor- und endogenem RhoA stünde natürlich entgegen dem Ziel, mit dem RhoA-Biosensor indirekt die Aktivität des endogenen RhoAs zu messen. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass zumindest die relative Verteilung aktiven Biosensor-RhoAs in der Zelle die gleiche ist wie die relative Verteilung aktiven endogenen RhoAs. Die Tatsache, dass das Biosensor-RhoA mit geringerer Effizienz an endogenes RhoGDI bindet, hat jedoch auch einen Vorteil: Es ist zu erwarten, dass die Überexpression des RhoA-Biosensors dadurch weniger drastisch in die endogenen Vorgänge in der Zelle eingreift, weil das endogene RhoGDI nach wie vor hauptsächlich zur Regulation der endogenen GTPasen zur Verfügung steht. Ein Hinweis darauf, dass die Biosensor-RBD die endogenen Signalprozesse vor einer Beeinträchtigung durch den RhoA-Biosensor schützt, findet sich in Abschnitt 4.2.2.7: Dort wurde beschrieben, dass Zellen, welche den Δ RBD-Q63L-Biosensor exprimierten, weniger und kleinere dynamische Membranausstülpungen bildeten als Zellen, die den Δ RBD-Biosensor exprimierten. Dies könnte der Effekt RhoA-vermittelter Kontraktilität sein. Schon eine frühe Studie hatte eine vergleichbare Wirkung konstitutiv aktiven RhoAs auf HGF-stimulierte MDCK-Zellen festgestellt (Ridley *et al.*, 1995). Ein

vergleichbarer Unterschied zwischen den RBD-tragenden WT- und Q63L-Biosensoren wurde in dieser Arbeit nicht festgestellt (Abschnitt 4.2.2.6). Es scheint daher, dass die Biosensor-RBD nicht nur die Interaktion des RhoA-Biosensors mit RhoGDI verringert, sondern auch mit endogenen Effektoren, wodurch die Zelle vor der Wirkung des konstitutiv aktiven RhoAs geschützt wird.

5.2.2.2.3 Die Q63L-Mutation im RhoA-Biosensor beeinflusst seine Membranbindung

In den Abschnitten 5.2.2.2.1 und 5.2.2.2.2 wurden jene Ergebnisse der TIRF-Messungen angeführt, die die Beobachtungen aus den Aufnahmen am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop bestätigten. Die TIRF-Messungen zeigten jedoch auch Unterschiede zwischen WT- und Q63L-Biosensor, die mit der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie nicht beobachtet worden waren: Bei den RhoA-Biosensor-Konstrukten ohne Membrananker zeigt jenes Konstrukt, welches keine weitere Mutation trägt, signifikant häufiger erhöhte Lokalisation in den Membranausstülpungen als das Konstrukt mit der Q63L-Mutation. Diese Beobachtung zeigt, dass der RhoA-Biosensor den Membrananker nicht zwingend benötigt, um an der Membran zu lokalisieren. Wie an der Lokalisation des mCherry-RBD-Konstruktes in dieser Arbeit und an anderen Studien mit vergleichbaren Translokations-RhoA-Biosensoren erkennbar ist (Nakaya *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008), ist der RBD-Teil des Biosensors ebenfalls prädestiniert dafür, den Biosensor in Regionen erhöhter RhoA-Aktivität zu lokalisieren. Da der RhoA-Biosensor im Gegensatz zum mCherry-RBD-Konstrukt aber auch selbst ein RhoA-Molekül enthält, bindet seine RBD vermutlich nur dann an endogenes RhoA, wenn das Biosensor-RhoA selbst inaktiv und daher keine intramolekulare Bindung möglich ist. Für den $\Delta 190$ -3-Q63L-Biosensor ist jedoch keine Inaktivierung des Biosensor-RhoAs möglich, was der Grund dafür sein könnte, dass er sich wesentlich seltener stark in Membranausstülpungen ansammelt als der $\Delta 190$ -3-Biosensor. Ein anderer signifikanter Unterschied zwischen zwei RhoA-Biosensor-Konstrukten in den TIRF-Experimenten lässt sich vermutlich nicht auf die gleiche Weise begründen: Es wurde festgestellt, dass die gleichmäßigere Membranbindung für den Q63L-Biosensor häufiger auftritt als für den WT-Biosensor. Dies sollte jedoch nicht zu der Vermutung führen, dass der Q63L-Biosensor insgesamt weniger an die Membran bindet als der WT-Biosensor: In Abschnitt 4.2.2.13 wurde gezeigt, dass es die Membranbindung der Biosensoren ist, die die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder insgesamt erhöht und die Unterscheidbarkeit von WT- und Q63L-Biosensor anhand dieses Kriteriums erlaubt: Da der Q63L-Biosensor hellere FRET/CFP-Quotientenbilder hat als der WT-Biosensor, bindet er vermutlich auch stärker an die

Plasmamembran, nicht etwa schwächer. Es ist daher eher zu vermuten, dass der Q63L-Biosensor bei der Membranbindung weniger als der WT-Biosensor auf die genaue Zusammensetzung der Membran oder sonstige Umgebungsbedingungen angewiesen ist. Seine Membranbindung wäre dadurch nicht nur verstärkt, sondern auch räumlich weniger limitiert. Separate Western Blots der Cytosol- und Membranfraktion von Zellen, die den WT- bzw. den Q63L-Biosensor exprimieren, könnten Aufschluss darüber geben, wie stark beide Konstrukte insgesamt an die Membran binden.

Eine abschließende Bemerkung soll verdeutlichen, dass der zur Beurteilung der TIRF-Bilder definierte Phänotyp „gleichmäßigerer“ Membranlokalisation nicht so zu verstehen ist, dass das Biosensor-Konstrukt in der entsprechenden Zelle tatsächlich im Bereich des Zellkörpers und in den Membranausstülpungen gleich stark an die Membran bindet. Dies ist am bevorzugten Erscheinungsbild der $\Delta 190$ -3- und Q63L- $\Delta 190$ -3-Biosensoren im TIRF-Feld zu erkennen: bei diesen beiden Konstrukten zeigte ein merklicher Anteil der Zellen die entgegengesetzte Lokalisation, der Zellkörper erschien also heller als die Membranausstülpungen. Dieser Effekt zeigt die Grenzen der verwendeten Methode auf: Obwohl die TIRF-Mikroskopie sich besonders gut eignet, um Prozesse an Zellmembranen zu untersuchen, kann auch sie Signal aus Membran-nahen Regionen nicht vollständig ausschließen. Mit dieser Methode erhält man stattdessen ein Bild, das einen Bereich von ungefähr 50-300 nm Dicke oberhalb des Probenträgers abbildet (Fish, 2009). So ist das höhere Signal im Bereich des Zellkörpers vermutlich nur die Auswirkung seines höheren Volumens gegenüber den Membranausstülpungen. Demnach sind auch in den Q63L-Biosensor-exprimierenden Zellen, die im TIRF-Feld gleichmäßige Signalverteilung zeigen, die Membranausstülpungen zur Bindung bevorzugt, jedoch nur so stark, dass der Volumeneffekt des Zellkörpers gerade ausgeglichen wird.

5.2.2.2.4 Die Membranbindung beeinflusst die Fluoreszenz von CFP und/oder YFP im RhoA-Biosensor

Der RhoA-Biosensor liegt in der Zelle sowohl membrangebunden, als auch cytosolisch vor. Ein membrangebundenes RhoA-Biosensor-Molekül befindet sich in einem anderen Milieu als ein cytosolisches: Bereits in Abschnitt 5.2.2.2.1 wurde eine Studie angeführt, in welcher für cAMP in Membrannähe ein verringerter Diffusions-Koeffizient und folglich auch eine vom Cytoplasma abweichende Konzentration festgestellt wurde (Karpen und Rich, 2004). Für Natrium-Ionen wurden vergleichbare Effekte beschrieben (Despa und Bers, 2003), jedoch wurden jene Untersuchungen zumeist an Myocyten durchgeführt. Obgleich die Unterschiede

in der Zusammensetzung von Cytosol und sub-Membran-Kompartiment noch relativ wenig charakterisiert wurden, ist davon auszugehen, dass sie zahlreich und komplex sind. So könnten sich auch die pH-Werte beider Kompartimente unterscheiden. Der pH-Wert wiederum ist ein kritischer Faktor für die Fluoreszenz der CFP-Variante, die auch im RhoA-Biosensor zum Einsatz kommt (Villoing *et al.*, 2008). Tatsächlich bestätigten die CAAX-Box-trunkierten RhoA-Biosensoren, dass die Membranbindung einer der Faktoren ist, die das Erscheinungsbild der Quotientenbilder und ihre Helligkeit beeinflussen. Ein Fehlen der Membranbindung eliminierte sowohl die Signalverteilungen innerhalb der individuellen FRET/CFP-Quotientenbilder (Abbildung 4.32 A), als auch den Unterschied in deren Gesamthelligkeit zwischen WT- und Q63L-Biosensor-exprimierenden Zellen (Abbildung 4.32 B). Der letztgenannte Effekt belegt, dass die Membranbindung das Signal der WT- und Q63L-Biosensoren tatsächlich verändert, anstatt nur die räumliche Separierung unterschiedlich fluoreszierender Molekül-Populationen zu erlauben. Für den T19N-Biosensor dagegen hat die Membranbindung weder einen Einfluss auf die Gesamthelligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder, noch auf den Helligkeitsunterschied zu den WT- und Q63L-Biosensoren, was noch einmal unterstreicht, dass er als Referenz für den WT-Biosensor ungeeignet ist (vgl. Abschnitt 5.2.2.1.4).

Bereits in Abschnitt 5.2.2.2 wurde erwähnt, dass RBD-trunkierte RhoA-Biosensor-Konstrukte ebenfalls bevorzugt in dynamischen Membranausstülpungen lokalisieren, und dies durch Inhibition der RhoGDI-Bindung noch verstärkt wird. Dennoch zeigen ihre FRET/CFP-Quotientenbilder nur eine viel schwächere Signalerhöhung in den Membranausstülpungen, als sie für RhoA-Biosensor-Konstrukte mit RBD typisch ist. Es scheint also, dass die Membranbindung die relative Intensität von YFP- und CFP-Fluoreszenz nur dann stark beeinflussen kann, wenn im Biosensor die intramolekulare Bindung zwischen RBD und RhoA ausgebildet ist. Untersuchungen zum Mechanismus dieses Einflusses sollten diese Erkenntnis berücksichtigen. Es ist denkbar, dass die Membranbindung hauptsächlich auf die Fluoreszenz des CFPs wirkt, denn dieses sitzt hinter der RBD, N-terminal vom YFP, auf das dann das RhoA folgt (Schema s. Abbildung 1.4). Sind zwei RhoA-Biosensor-Moleküle C-terminal an die Plasmamembran gebunden, von denen jedoch nur eines die intramolekulare RBD-Bindung ausgebildet hat, unterscheiden sich daher die Milieus, in denen sich die beiden CFP-Anteile der Moleküle befinden, vermutlich stärker als die Milieus, in denen sich die YFP-Anteile der Moleküle befinden.

5.2.2.3 Fazit: Der FRET-basierte RhoA-Biosensor bietet nur geringe Vorteile gegenüber Translokations-RhoA-Biosensoren

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der postulierte FRET-basierte Mechanismus im RhoA-Biosensor von Pertz *et al.* höchstens sehr eingeschränkt wirkt. Des Weiteren sind die Ergebnisse des RhoA-Biosensors nicht unmittelbar vom Nukleotid-Bindungszustand des Biosensor-RhoAs abhängig, sondern werden durch seine Bindung an die Membran bestimmt. Der Zustand der Zelle bzw. ihr lokal unterschiedlicher Bedarf an membrangebundenem RhoA scheint für das Signal des Biosensors entscheidender zu sein als der Aktivierungszustand des Biosensor-RhoAs selbst. Qualitativ könnte der RhoA-Biosensor dadurch selbst dann noch interpretierbare Ergebnisse liefern, wenn er, wie vermutet, kaum den endogenen Regulationsmechanismen unterliegt. Das anhand der Ergebnisse aus dieser Arbeit entworfene Modell für den Mechanismus des RhoA-Biosensors ist noch nicht vollständig und erfordert weitere Verfeinerung und Verifizierung. In weiterführenden Untersuchungen könnten Zellen, die unterschiedliche RhoA-Biosensor-Konstrukte exprimieren, RhoA-aktivierenden Stimuli ausgesetzt werden. Dies würde zeigen, für welche Konstrukte sich die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder infolge des Stimulus erhöht. Nach dem vorgeschlagenen Modell wäre dies zwar für den Q63L-Biosensor der Fall, obgleich er selbst nicht weiter aktiviert werden kann, für die $\Delta 190$ -3- und $\Delta 190$ -3-Q63L-Biosensoren jedoch nicht. Es wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit versucht, entsprechende Experimente am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop durchzuführen. Die statistischen Schwankungen innerhalb der Populationen waren jedoch so groß, dass nicht einmal durch Untersuchung derselben Zellen vor und nach dem Stimulus verlässliche Ergebnisse erhalten werden konnten (nicht gezeigt). Entsprechende Experimente müssten demnach wesentlich größere Populationen von Zellen umfassen. Messungen an einem ImageStream-System, das Flusscytometrie mit Fluoreszenz-Mikroskopie verbindet, würden diese Voraussetzung erfüllen. Sollte sich das in dieser Arbeit vorgeschlagene Modell zum Mechanismus bestätigen, würde damit jedoch auch ein Nachteil des RhoA-Biosensors belegt: Er könnte weder Information über etwaiges cytosolisches, aktives RhoA liefern, noch quantitative Informationen darüber, welcher Anteil des membrangebundenen RhoAs inaktiv ist. Das grundlegende Modell der Regulation von und durch RhoA in der Zelle beinhaltet zwar die Annahme, dass RhoA an der Plasmamembran aktiviert wird und dort auch mit seinen Effektoren interagiert, während inaktives RhoA durch RhoGDI aus der Membran extrahiert und als schnell verfügbarer Vorrat im Cytosol gehalten wird (Guilluy *et al.*, 2011; Garcia-Mata *et al.*, 2011). Dennoch legen einige Studien die Vermutung nahe, dass die tatsächlich

Verteilung aktiven RhoAs sich auch auf das Cytosol erstrecken könnte: So bildet RhoGDI auch mit aktivem RhoA einen sehr stabilen Komplex (Tnimmov *et al.*, 2012). Die Phosphorylierung von RhoA erhöht nicht nur für inaktives, sondern auch für aktives RhoA die Bindung an RhoGDI und führt *in vivo* zur Erhöhung der cytosolischen Menge aktiven RhoAs (Rolli-Derkinderen *et al.*, 2005). Die Frage, ob und wie sich solche Affinitäten auf die Verteilung aktiven RhoAs in der Zelle auswirken, sollte eigentlich durch RhoA-Biosensoren geklärt werden; dies gelingt jedoch nur, wenn ihr Mechanismus zur Detektion von membrangebundenem und cytosolischem aktivem RhoA gleichermaßen geeignet ist.

Ein simpler Translokations-RhoA-Biosensor, der lediglich aus einer Fluoreszenz-markierten RBD besteht, hat den Nachteil, dass GTPase-gebundene RBD-Moleküle nicht von freien unterschieden werden können. Seine quantitative Aussagekraft wird dadurch eingeschränkt. Die Quantifizierbarkeit der Ergebnisse des FRET-basierten RhoA-Biosensors ist jedoch nach den Ergebnissen aus dieser Arbeit ebenfalls gering. Es ist daher zweifelhaft, ob er gegenüber einem Translokations-Biosensor Vorteile bietet, die die aufwändige und fehleranfällige Bildanalyse rechtfertigen. Kürzlich wurde jedoch eine Studie mit einem neuen FRET-basierten RhoA-Biosensor publiziert (Hinde *et al.*, 2013). Bei diesem handelt es sich um den ersten in der Literatur beschriebenen bimolekularen RhoA-Biosensor. Mittels FLIM wurde die RhoA-Aktivität in Fibroblasten unmittelbar nach LPA-Stimulation untersucht. Interessanterweise zeigte dieser RhoA-Biosensor in den betrachteten Zellen zumeist einen größeren Anstieg der RhoA-Aktivität im Zellkörper als in den Membranausstülpungen. Demselben Labor entstammt eine Studie, in der die RhoA-Aktivität in COS-7 Zellen unmittelbar nach LPA-Stimulation untersucht wurde (Hinde *et al.*, 2012). Die verwendete Methode war ebenfalls FLIM, der verwendete RhoA-Biosensor jedoch war der auch in dieser Arbeit genutzte. Dieser Biosensor zeigte für die COS-7-Zellen hauptsächlich einen Anstieg der RhoA-Aktivität in den Membranausstülpungen, wie sie auch in dieser Arbeit gefunden wurde. Wenngleich es denkbar ist, dass diese gegensätzlichen Ergebnisse aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Zelllinien entstanden, so kann es doch auch sein, dass sie mit dem jeweils verwendeten Biosensor im Zusammenhang stehen. Es wäre daher besonders interessant, verschiedene Varianten beider RhoA-Biosensoren parallel zu untersuchen. Der neue, bimolekulare RhoA-Biosensor ist in der Anwendung und Datenanalyse nicht einfacher zu handhaben als der in dieser Arbeit charakterisierte: Er erfordert aufgrund seines bimolekularen Charakters sogar zusätzliche Kontrollmessungen und Korrekturrechnungen (Hodgson *et al.*, 2010). Dennoch könnte er möglicherweise ein zuverlässiges Werkzeug zur quantitativen Untersuchung der RhoA-Aktivität in lebenden Zellen darstellen.

Die Charakterisierung des RhoA-Aktivitäts-Biosensors im Rahmen dieser Arbeit lieferte wichtige neue Erkenntnisse über den Mechanismus einer hochentwickelten Untersuchungsmethode für RhoA. Die Tatsache, dass der Mechanismus des Biosensors offenbar nicht vollständig bekannt ist, ist umso erstaunlicher, als die Methode schon seit mehreren Jahren zur Beantwortung biologischer Fragestellungen angewandt wird. Der bleibende Nutzen dieser Arbeit ist es daher, für die Anwendung und insbesondere für die Konstruktion anderer Aktivitäts-Biosensoren – nicht nur für RhoA, sondern auch für andere kleine GTPasen und sogar darüber hinaus – konkrete Anregungen für zusätzliche Kontrolluntersuchungen zu liefern. Für aktuelle und zukünftige Biosensoren kann so schneller ein umfassendes Bild darüber erstellt werden, wie sich der Biosensor und das intrazelluläre Regulationsnetzwerk gegenseitig beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- Abe, K., Rossman, K.L., Liu, B., Ritola, K.D., Chiang, D., Campbell, S.L., Burridge, K. und Der, C.J. (2000). Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J. Biol. Chem.* 275, 10141-10149.
- Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A. und Tilbrook, P.A. (1992a). Post-translational modifications of p21rho proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 20033-20038.
- Adamson, P., Paterson, H.F. und Hall, A. (1992b). Intracellular localization of the P21rho proteins. *J. Cell Biol.* 119, 617-627.
- Alekseev, A.E., Reyes, S., Selivanov, V.A., Dzeja, P.P. und Terzic, A. (2012). Compartmentation of membrane processes and nucleotide dynamics in diffusion-restricted cardiac cell microenvironment. *J. Mol. Cell Cardiol.* 52, 401-409.
- Arthur, W.T., Pethc, L.A. und Burridge, K. (2000). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 10, 719-722.
- Baisamy, L., Cavin, S., Jurisch, N. und Diviani, D. (2009). The ubiquitin-like protein LC3 regulates the Rho-GEF activity of AKAP-Lbc. *J. Biol. Chem.* 284, 28232-28242.
- Barberis, D., Casazza, A., Sordella, R., Corso, S., Artigiani, S., Settleman, J., Comoglio, P.M. und Tamagnone, L. (2005). p190 Rho-GTPase activating protein associates with plexins and it is required for semaphorin signalling. *J. Cell Sci.* 118, 4689-4700.
- Berg, T.J., Gastonguay, A.J., Lorimer, E.L., Kuhnmuench, J.R., Li, R., Fields, A.P. und Williams, C.L. (2010). Splice variants of SmgGDS control small GTPase prenylation and membrane localization. *J. Biol. Chem.* 285, 35255-35266.
- Borst, J.W., Willemse, M., Slijkhuis, R., van der Krogt, G., Laptenok, S.P., Jalink, K., Wieringa, B. und Fransen, J.A. (2010). ATP changes the fluorescence lifetime of cyan fluorescent proteins via an interaction with His148. *PLoS One* 5, e13862
- Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P.J. und Burridge, K. (2010). Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat. Cell Biol.* 12, 477-483.
- Boureaux, A., Vignal, E., Faure, S. und Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* 24, 203-216.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bryant, S.S., Briggs, S., Smithgall, T.E., Martin, G.A., McCormick, F., Chang, J.H., Parsons, S.J. und Jove, R. (1995). Two SH2 domains of p120 Ras GTPase-activating protein bind synergistically to tyrosine phosphorylated p190 Rho GTPase-activating protein. *J. Biol. Chem.* 270, 17947-17952.

- Buus, R., Faronato, M., Hammond, D.E., Urbé, S. und Claque, M.J. (2009). Deubiquitinase activities required for hepatocyte growth factor-induced scattering of epithelial cells. *Curr Biol.* *19*, 1463-1466.
- Cannon, J.L., Labno, C.M., Bosco, G., Seth, A., McGavin, M.H., Siminovitch, K.A., Rosen, M.K. und Burkhardt, J.K. (2001). Wasp recruitment to the T cell:APC contact site occurs independently of Cdc42 activation. *Immunity* *15*, 249-259.
- Chalfoun, J., Kociolek, M., Dima, A., Halter, M., Cardone, A., Peskin, A., Bajcsy, P. und Brady, M. (2013). Segmenting time-lapse phase contrast images of adjacent NIH 3T3 cells. *J. Microsc.* *249*, 41-52.
- Chang, J.H., Gill, S., Settleman, J. und Parsons, S.J. (1995). c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP und p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J. Cell Biol.* *130*, 355-368.
- Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M.R., Rubin, E.J., and Gill, D.M. (1989). The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J.* *8*, 1087-1092.
- Chen, F., Ma, L., Parrini, M.C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P.W., Davidson, L., Kwiatkowski, D.J., Kirchhausen, T., Orkin, S.H., Rosen, F.S., Mayer, B.J., Kirschner, M.W. und Alt, F.W. (2000). Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr. Biol.* *10*, 758-765.
- Chen, Y., Yang, Z., Meng, M., Zhao, Y., Dong, N., Yan, H., Liu, L., Ding, M., Peng, H.B. und Shao, F. (2009). Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement. *Mol. Cell* *35*, 841-855.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. und Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* *133*, 1403-1415.
- Cozzolino, M., Stagni, V., Spinardi, L., Campioni, N., Fiorentini, C., Salvati, E., Alemà, S. und Salvatore, A.M. (2003). P120 Catenin is required for growth factor-dependent cell motility and scattering in epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1964-1977.
- Despa, S. und Bers, D.M. (2003). Na/K pump current and [Na]⁺ in rabbit ventricular myocytes: local [Na]⁺ depletion and Na buffering. *Biophys. J.* *84*, 4157-4166.
- Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clément, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Gagnoux, L., Piechaczyk, M., Boquet, P. und Lemichez, E. (2002). CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* *111*, 553-564.
- Ellerbroek, S.M., Wennerberg, K. und Burridge, K. (2003). Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J. Biol. Chem.* *278*, 19023-19031.
- Ellis, C., Moran, M., McCormick, F. und Pawson, T. (1990). Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* *343*, 337-381.

- Feig, L.A. und Cooper, G.M. (1988). Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol. Cell Biol.* 8, 3235-3243.
- Fenteany, G., Standaert, R.F., Lane, W.S., Choi, S., Corey, E.J. und Schreiber, S.L. (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 268, 726-731.
- Fish, K.N. (2009). Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.* 12.18.
- Forget, M.A., Desrosiers, R.R., Gingras, D. und Béliveau, R. (2002). Phosphorylation states of Cdc42 and RhoA regulate their interactions with Rho GDP dissociation inhibitor and their extraction from biological membranes. *Biochem. J.* 361, 243-254.
- Förster, Th. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* 437, 55–75.
- Freeman, W.M., Walker, S.J. und Vrana, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26, 112-125.
- Friedl, P. und Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3, 362-374.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E. und Burridge, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 493-504.
- Gaush, C.R., Hard, W.L. und Smith, T.F. (1966). Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122, 931-935.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. und Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417-1423.
- Grailhe, R., Merola, F., Ridard, J., Couvignou, S., Le Poupon, C., Changeux, J.P. und Laguitton-Pasquier, H. (2006). Monitoring protein interactions in the living cell through the fluorescence decays of the cyan fluorescent protein. *Chemphyschem* 7, 1442-1454.
- Grant, S.G.N., Jessee, J., Bloom, F.R. und Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4645-4649.
- Greenburg, G. und Hay, E.D. (1982). Epithelia suspended in collagen Gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* 95, 333-339.
- Griesbeck, O., Baird, G.S., Campbell, R.E., Zacharias, D.A. und Tsien, R.Y. (2001). Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J. Biol. Chem.* 276, 29188-29194.

- Gu, Y., Filippi, M.D., Cancelas, J.A., Siefring, J.E., Williams, E.P., Jasti, A.C., Harris, C.E., Lee, A.W., Prabhakar, R., Atkinson, S.J., Kwiatkowski, D.J. und Williams, D.A. (2003). Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 302, 445-449.
- Guilluy, C., Garcia-Mata, R. und Burridge, K. (2011). Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol.* 21, 718-726.
- Hakoshima, T., Shimizu, T. und Maesaki, R. (2003). Structural basis of the Rho GTPase signalling. *J. Biochem.* 134, 327-331.
- Hammond, D.E., Hyde, R., Kratchmarova, I., Beynon, R.J., Blagoev, B. und Claque, M.J. (2010). Quantitative analysis of HGF and EGF-dependent phosphotyrosine signaling networks. *J. Proteome Res.* 9, 2734-2742.
- Hancock, J.F. und Hall, A. (1993). A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. *EMBO J.* 12, 1915-1921.
- Hart, M.J., Eva, A., Zangrilli, D., Aaronson, S.A., Evans, T., Cerione, R.A. und Zheng, Y. (1994). Cellular transport and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J. Biol. Chem.* 269, 62-65.
- Hart, M.J., Maru, Y., Leonard, D., Witte, O.N., Evans, T. und Cerione, R.A. (1992). A GDP dissociation inhibitor that serves as a GTPase inhibitor for the Ras-like protein CDC42Hs. *Science* 258, 812-815.
- Haskell, M.D., Nickles, A.L., Agati, J.M., Su, L., Dukes, B.D. und Parsons, S.J. (2001). Phosphorylation of p190 on Tyr1105 by c-Src is necessary but not sufficient for EGF-induced actin disassembly in C3H10T1/2 fibroblasts. *J. Cell Sci.* 114, 1699-1708.
- Hill, C., Wynne, J. und Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81, 1159-1170.
- Hinde, E., Digman, M.A., Hahn, K.M. und Gratton, E. (2013). Millisecond spatiotemporal dynamics of FRET biosensors by the pair correlation function and the phasor approach to FLIM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 135-140.
- Hinde, E., Digman, M.A., Welch, C., Hahn, K.M. und Gratton, E. (2012). Biosensor Förster resonance energy transfer detection by the phasor approach to fluorescence lifetime imaging microscopy. *Microsc. Res. Tech.* 75, 271-281.
- Ho, T.T., Merajver, S.D., Lapière, C.M., Nusgens, B.V. und Deroanne, C.F. (2008). RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J. Biol. Chem.* 283, 21588-21598.
- Hodgson, L., Shen, F. und Hahn, K. (2010). Biosensors for characterizing the dynamics of rho family GTPases in living cells. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 14.11.1-26.

- Hoshijima, M., Kondo, J., Kikuchi, A., Yamamoto, K., and Takai, Y. (1990). Purification and characterization from bovine brain membranes of a GTP-binding protein with a Mr of 21,000, ADP-ribosylated by an ADP-ribosyltransferase contaminated in botulinum toxin type C1 -- identification as the rhoA gene product. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 7, 9-16.
- Huang, C.H., Sankaran, S., Racoceanu, D., Hariharan, S. und Ahmed, S. (2012). Online 3-D tracking of suspension living cells imaged with phase-contrast microscopy. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 59, 1924-1933.
- Hussain, N.K., Jenna, S., Glogauer, M., Quinn, C., Wasiak, S., Guipponi, M., Antonarakis, S.E., Kay, B.K., Stossel, T.P., Lamarche-Vane, N. und McPherson, P.S. (2001). Endocytic protein intersectin-I regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat. Cell Biol.* 3, 927-932.
- Ichimura, E., Maeshima, A., Nakajima, T. und Nakamura, T. (1996). Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. *Jpn. J. Cancer Res.* 87, 1063-1069.
- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K. und Hakoshima, T. (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J. Biol. Chem.* 273, 9656-9666.
- Ishizaki, T. Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N. und Narumiya, S. (1996). The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.* 15, 1885-1893.
- Jiménez, B., Arends, M., Esteve, P., Perona, R., Sánchez, R., Ramón y Cajal, S., Wyllie, A. und Lacal, J.C. (1995). Induction of apoptosis in NIH3T3 cells after serum deprivation by overexpression of rho-p21, a GTPase protein of the ras superfamily. *Oncogene* 10, 811-816.
- Karasawa, S., Araki, T., Nagai, T., Mizuno, H., Miyawaki, A. (2004). Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem. J.* 381, 307-312.
- Karpen, J.W. und Rich, T.C. (2004). Resolution of cAMP signals in three-dimensional microdomains using novel, real-time sensors. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 47, 1-5.
- Katayama, M., Kawata, M., Yoshida, Y., Horiuchi, H., Yamamoto, T., Matsuura, Y. und Takai, Y. (1991). The posttranslationally modified C-terminal structure of bovine aortic smooth muscle rhoA p21. *J. Biol. Chem.* 266, 12639-12645.
- Khosravi-Far, R., Chrzanowska-Wodnicka, M., Soltski, P.A., Eva, A., Burrridge, K. und Der, C.J. (1994). Db1 and Vav mediate transformation via mitogen-activated protein kinase pathways that are distinct from those activated by oncogenic Ras. *Mol. Cell Biol.* 14, 6848-6857.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.

- Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., Narumiya, S. und Inagaki, M. (2000). Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene* 19, 6059-6064.
- Kraynov, V.S., Chamberlain, C., Bokoch, G.M., Schwartz, M.A., Slabaugh, S. und Hahn, K.M. (2000). Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* 290, 333-337.
- Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K. und Ito, M. (1997). Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 272, 12257-12260.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, J.F., Kao, S.C., Jiang, S.T., Tang, M.J., Chan, P.C. und Chen, H.C. (2000). Involvement of focal adhesion kinase in hepatocyte growth factor-induced scatter of Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 275, 7474-7480.
- Lang, P., Gesbert, F., Delespine-Carmagnat, M., Stancou, R., Pouchelet, M. und Bertoglio, J. (1996). Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J.* 15, 510-519.
- Lelias, J.M., Adra, C.N., Wulf, G.M., Guillemot, J.C., Khagad, M., Caput, D. und Lim, B. (1993). cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1479-1483.
- LePecq, J.B. und Paoletti, C. (1967). A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization. *J. Mol. Biol.* 27, 87-106.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L. und Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J. Biol. Chem.* 270, 29051-29054.
- Lévay, M., Settleman, J. und Ligeti, E. (2009). Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site. *Biochemistry* 48, 8615-8623.
- Leve, F., Marcondes, T.G., Bastos, L.G., Rabello, S.V., Tanaka, M.N. und Morgado-Díaz, J.A. (2011). Lysophosphatidic acid induces a migratory phenotype through a crosstalk between RhoA-Rock and Src-FAK signalling in colon cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.* 671, 7-17.
- Li, R., Zhang, B. und Zheng, Y. (1997). Structural determinants required for the interaction between Rho GTPase and the GTPase-activating domain of p190. *J. Biol. Chem.* 272, 32830-32835.
- Liang, X., Draghi, N.A. und Resh, M.D. (2004). Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *J. Neurosci.* 24, 7140-7149.

- Ligeti, E., Dagher, M.C., Hernandez, S.E., Koleske, A.J. und Settleman, J. (2004). Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *J. Biol. Chem.* 279, 5055-5058.
- Longenecker, K., Read, P., Derewenda, U., Dauter, Z., Liu, X., Garrard, S., Walker, L., Somlyo, A.V., Nakamoto, R.K., Somlyo, A.P. und Derewenda, Z.S. (1999). How RhoGDI binds Rho. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 55, 1503-1515.
- Longenecker, K., Read, P., Lin, S.K., Somlyo, A.P., Nakamoto, R.K. und Derewenda, Z.S. (2003). Structure of a constitutively activated RhoA mutant (Q63L) at 1.55 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59, 876-880.
- Luisier, F., Blu, T. und Unser, M. (2011). Image denoising in mixed Poisson-Gaussian noise. *IEEE Trans. Image Process.* 20, 696-708.
- Lynch, E.A., Stall, J., Schmidt, G., Chavrier, P. und D'Souza-Schorey, C. (2006). Proteasome-mediated degradation of Rac1-GTP during epithelial cell scattering. *Mol. Biol. Cell* 17, 2236-2242.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G.L., Hahn, K.M. und Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99-103.
- Madaule, P. und Axel, R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell* 41, 31-40.
- Maddox, A.S., und Burridge, K. (2003). RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J. Cell Biol.* 160, 255-265.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. und Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.
- Maesaki, R., Ihara, K., Shimizu, T., Kuroda, S., Kaibuchi, K. und Hakoshima, T. (1999). The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1. *Mol. Cell* 4, 793-803.
- Massoudi, A., Semenovich, D. und Sowmya, A. (2012). Cell tracking and mitosis detection using splitting flow networks in phase-contrast imaging. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2012, 5310-5313.
- Masuda-Robens, J.M., Kutney, S.N., Qi, H. und Chou, M.M. (2003). The TRE17 oncogene encodes a component of a novel effector pathway for Rho GTPases Cdc42 and Rac1 and stimulates actin remodeling. *Mol. Cell Biol.* 23, 2151-2161.
- Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zarasky, A.G., Markelov, M.L. und Lukyanov, S.A. (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17, 969-973.

- Mayer, T., Meyer, M., Janning, A., Schiedel, A.C. und Barnekow, A. (1999), A mutant form of the rho protein can restore stress fibers and adhesion plaques in v-src transformed fibroblasts. *Oncogene* 18, 2117-2128.
- McGlade, J., Brunkhorst, B., Anderson, D., Mbamalu, G., Settleman, J., Dedhar, S., Rozakis-Adcock, M., Chen, L.B. und Pawson, T. (1993). The N-terminal region of GAP regulates cytoskeletal structure and cell adhesion. *EMBO J.* 12, 3073-3081.
- Melendez, J., Andreassen, P., Lang, R. and Zheng, Y. (2011). RhoA is dispensable for ROCK regulation and actin stress fiber and focal adhesion formation but is essential for mouse early embryonic development and cell mitosis. *Mol. Biol. Cell* 22, 3555 (2510/S-L106).
- Miao, H., Nickel, C.H., Cantley, L.G., Bruggemann, L.A., Bennardo, L.N. und Wang, B. (2003). EphA kinase activation regulates HGF-induced epithelial branching morphogenesis. *J. Cell Biol.* 162, 1281-1292.
- Michaelson, D., Silletti, J., Murphy, G., D'Eustachio, P., Rush, M. und Philips, M.R. (2001). Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Biol.* 152, 111-126.
- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I. und Treisman, R. (2003). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329-342.
- Miyazaki, K., Yano, T., Schmidt, D.J., Tokui, T., Shibata, M., Lifshitz, L.M., Kimura, S., Tuft, R.A. und Ikebe, M. (2002). Rho-dependent agonist-induced spatio-temporal change in myosin phosphorylation in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 277, 725-734.
- Molina-Ortiz, I., Bartolomé, R.A., Hernández-Varas, P., Colo, G.P. und Teixidó, J. (2009). Overexpression of E-cadherin on melanoma cells inhibit chemokine-promoted invasion involving p190RhoGAP/p120ctn-dependent inactivation of RhoA. *J. Biol. Chem.* 284, 15147-15157.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DANN in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.
- Nakaya, Y., Sukowati, E.W., Wu, Y. und Sheng, G. (2008). RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat. Cell Biol.* 10, 765-775.
- Nalbant, P., Hodgson, L., Kraynov, V., Touthkine, A. und Hahn, K.M. (2004). Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science* 305, 1615-1619.
- Nassar, N., Singh, K. und Garcia-Diaz, M. (2010). Structure of the dominant negative S17N mutant of Ras. *Biochemistry* 49, 1970-1974.
- Nimnual, A.S., Taylor, L.J. und Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat. Cell Biol.* 5, 236-241.

- Nobes, C.D. und Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Nobes, C.D. und Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* 144, 1235-1244.
- Noren, N.K., Arthur, W.T. und Burridge, K. (2003). Cadherin engagement inhibits RhoA via p190ARhoGAP. *J. Biol. Chem.* 278, 13615-13618.
- Nusser, N., Gosmanova, E., Makarova, N., Fujiwara, Y., Yang, L., Guo, F., Luo, Y., Zheng, Y. und Tigyi, G. (2006). Serine phosphorylation differentially affects RhoA binding to effectors: implications to NGF-induced neurite outgrowth. *Cell Signal.* 18, 704-714.
- Ohta, Y., Hartwig, J.H. und Stossel, T.P. (2006). FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat. Cell Biol.* 8, 803-814.
- Palazzo, A.F., Cook, T.A., Alberts, A.S. und Gundersen, G.G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat. Cell Biol.* 3, 723-729.
- Park, T.J., Mitchell, B.J., Abitua, P.B., Kintner, C. und Wallingford, J.B. (2008). Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells. *Nat. Genet.* 40, 871-879.
- Paterson, H.F., Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K. und Hall, A. (1990). Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J. Cell Biol.* 111, 1001-1007.
- Pellegrin, S. und Mellor, H. (2008). RhoGTPase activation assays. *Curr. Protoc. Cell Biol.* 38, 14.8.1-14.8.19.
- Pertz, O. (2010). Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J. Cell Sci.* 123, 1841-1850.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L. und Hahn, K.M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069-1072.
- Pertz, O.C., Wang, Y., Yang, F., Wang, W., Gay, L.J., Gristenko, M.A., Clauss, T.R., Anderson, D.J., Liu, T., Auberry, K.J., Camp, D.G. 2nd, Smith, R.D. und Klemke, R.L. (2008). Spatial mapping of the neurite and soma proteomes reveals a functional Cdc42/Rac regulatory network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1931-1936.
- Rahimi, N., Hung, W., Tremblay, E., Saulnier, R. und Elliott, B. (1998). C.Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 33714-33721.
- Ren, X.D., Kiosses, W.B. und Schwartz, M.A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* 18, 578-585.

- Renart, J., Reiser, J. und Stark, G.R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 3116-3120.
- Ridley, A.J., Comoglio, P.M. und Hall, A. (1995). Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol. Cell Biol.* 15, 1110-1122.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. und Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.
- Ridley, A.J., Self, A.J., Kasmi, F., Paterson, H.F., Hall, A., Marshall, C.J. und Ellis, C. (1993). rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J.* 12, 5151-5160.
- Rittinger, K., Walker, P.A., Eccleston, J.F., Smerdon, S.J. und Gamblin, S.J. (1997). Structure at 1.65 Å of RhoA and its GTPase-activating protein in complex with a transition-state analogue. *Nature* 389, 758-762.
- Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B. und Piston, D.W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat. Biotechnol.* 22, 445-449.
- Rolli-Derkinderen, M., Sauzeau, V., Boyer, L., Lemichez, E., Baron, C., Henrion, D., Loirand, G. und Pacaud, P. (2005). Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 96, 1152-1160.
- Roof, R.W., Haskell, M.D., Dukes, B.D., Sherman, N., Kinter, M. und Parsons, S.J. (1998). Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol. Cell Biol.* 18, 7052-7063.
- Rosenblatt, J., Cramer, L.P., Baum, B. und McGee, K.M. (2004). Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell* 117, 361-372.
- Rutledge, R.G. und Stewart, D. (2008). Critical evaluation of methods used to determine amplification efficiency refutes the exponential character of real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 9, 96.
- Sahai, E. und Marshall, C.J. (2002). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat. Cell Biol.* 4, 408-415.
- Sander, E.E., ten Klooster, J.P., van Delft, S., van der Kammen, R.A. und Collard, J.G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behaviour. *J. Cell Biol.* 147, 1009-1022.

- Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E. und Marshall, C.J. (2008). Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell* 135, 510-523.
- Sasaki, T., Kato, M. und Takai, Y. (1993). Consequences of weak interaction of rho GDI with the GTP-bound forms of rho p21 and rac p21. *J. Biol. Chem.* 268, 23959-23963.
- Sauzeau, V. Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S.M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P. und Loirand, G. (2000). Cyclin GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 275, 21722-21729.
- Settleman, J., Albright, C.F., Foster, L.C. und Weinberg, R.A. (1992). Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature* 359, 153-154.
- Shamah, S.M., Lin, M.Z., Goldberg, J.L., Estrach, S., Sahin, M., Hu, L., Bazalakova, M., Neve, R.L., Corfas, G., Debant, A. und Greensberg, M.E. (2001). EphA receptors regulate growth cone dynamics through the novel guanine nucleotide exchange factor ephexin. *Cell* 105, 233-244.
- Shaner, N.C., Campbell, R.E., Steinbach, P.A., Giepmans, B.N., Palmer, A.E. und Tsien, R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567-1572.
- Shimomura, O., Johnson, F.H. und Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.* 59, 223-239.
- Singh, U.S., Kunar, M.T., Kao, Y.L. und Baker, K.M. (2001). Role of transglutaminase II in retinoic acid-induced activation of RhoA-associated kinase-2. *EMBO J.* 20, 22413-2423.
- Snyder, J.T., Worthylake, D.K., Rossman, K.L., Betts, L., Pruitt, W.M., Siderovski, D.P., Der, C.J. und Sondek, J. (2002). Structural basis for the selective activation of RhoGTPases by Dbl exchange factors. *Nat. Struct. Biol.* 9, 468-475.
- Soh, U.J. und Low, B.C. (2008). BNIP2 extra long inhibits RhoA and cellular transformation by Lbc RhoGEF via its BCH domain. *J. Cell Sci.* 121, 1739-1749.
- Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J. und Treisman, R. (1999). Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 98, 159-169.
- Strassheim, D., Porter, R.A., Phelps, S.H. und Williams, C.L. (2000). Unique in vivo associations with SmgGDS and RhoGDI and different guanine nucleotide exchange activities exhibited by RhoA, dominant negative RhoA(Asn-19), and activated RhoA(Val-14). *J. Biol. Chem.* 275, 6699-6702.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.

- Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A. und Katsuki, M. (1998). Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17, 3427-3433.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kato, M., Yamochi, W., Kuroda, S., Nakamura, T., Takechi, M. und Takai, Y. (1994). Involvement of Rho p21 small GTP binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene* 9, 273-279.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kameyama, T., Tsukita, S., Tsukita, S. und Takai, Y. (1995). Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. *Oncogene* 11, 39-48.
- Takanami, I., Tanana, F., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T. und Kodaira, S. (1996). Hepatocyte growth factor and c-Met/hepatocyte growth factor receptor in pulmonary adenocarcinomas: an evaluation of their expression as prognostic markers. *Oncology* 53, 392-397.
- Tatsis, N., Lannigan, D.A. und Macara, I.G. (1998). The function of the p190 Rho GTPase-activating protein is controlled by its N-terminal GTP binding domain. *J. Biol. Chem.* 273, 34631-34638.
- Tkachenko, E., Sabouri-Ghomi, M., Pertz, O., Kim, C., Gutierrez, E., Machacek, M., Groisman, A., Danuser, G. und Ginsberg, M.H. (2011). Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells. *Nat. Cell Biol.* 13, 660-667.
- Tnimov, Z., Guo, Z., Gambin, Y., Nguyen, U.T., Wu, Y.W., Abankwa, D., Stigter, A., Collins, B.M., Waldmann, H., Goody, R.S. und Alexandrov, K. (2012). Quantitative analysis of prenylated RhoA interaction with its chaperone, RhoGDI. *J. Biol. Chem.* 287, 26549-26562.
- Tomar, A., Lim, S.T., Lim, Y. und Schlaepfer, D.D. (2009). A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J. Cell Sci.* 122, 1852-1862.
- Trimboli, A.J., Fukino, K., de Bruin, A., Wie, G., Shen, L., Tanner, S.M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson, M.L., Eng, C., Ostrowski, M.C. und Leone, G. (2008). Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* 68, 937-945.
- Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J. und Takai, Y. (1990). Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 265, 9373-9380.
- Veettil, M.V., Sharma-Walia, N., Sadagopan, S., Raghu, H., Sivakumar, R., Naranatt, P.P. und Chandran, B. (2006). RhoA-GTPase facilitates entry of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus into adherent target cells in a Src-dependent manner. *J. Virol.* 80, 11432-11446.
- Vega, F.M., Fruhwirth, G., Ng, T. und Ridley, A.J. (2011). RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J. Cell Biol.* 193, 655-665.

- Villoing, A., Ridhoir, M., Cinquin, B., Erard, M., Alvarez, L., Vallverdu, G., Pernot, P., Grailhe, R., Mérola, F. und Pasquier, H. (2008). Complex fluorescence of the cyan fluorescent protein: comparisons with the H148D variant and consequences for quantitative cell imaging. *Biochemistry* 47, 12483-12492.
- Walther, D.J., Peter, J.U., Winter, S., Hölte, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinkel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C.S., Ahnert-Hilger, G. und Bader, M. (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* 115, 851-862.
- Walther, K.A., Papke, B., Sinn, M.B., Michel, K. und Kinkhabwala, A. (2011). Precise measurement of protein interacting fractions with fluorescence lifetime imaging microscopy. *Mol. Biosyst.* 7, 322-336.
- Wang, H.R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A.A., Alexandrova, E., Thomsen, G.H. und Wrana, J.L. (2003). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 302, 1775-1779.
- Wang, Y.L. (2007). Noise-induced systematic errors in ratio imaging: serious artefacts and correction with multi-resolution denoising. *J. Microsc.* 228, 123-131.
- Watanabe, N. und Mitchison, T.J. (2002). Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science* 295, 1083-1086.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T. und Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* 1, 136-143.
- Wells, C.M., Ahmed, T., Masters, J.R. und Jones, G.E. (2005). Rho family GTPases are activated during HGF-stimulated prostate cancer-cell scattering. *Cell Motil. Cytoskeleton* 62, 180-194.
- Wennerberg, K., Forget, M.A., Ellerbroek, S.M., Arthur, W.T., Burridge, K., Settleman, J., Der, C.J. und Hansen, S.H. (2003). Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr. Biol.* 13, 1106-1115.
- Willemse, M., Janssen, E., de Lange, F., Wieringa, B. und Fransen, J. (2007). ATP and FRET -- a cautionary note. *Nat. Biotechnol.* 25, 170-172.
- Worby, C.A., Mattoo, S., Kruger, R.P., Corbeil, L.B., Koller, A., Mendez, J.C., Zekarias, B., Lazar, C. und Dixon, J.E. (2009). The fic domain: regulation of cell signalling by adenylylation. *Mol. Cell* 34, 93-103.
- Yamashiro, S., Totsukawa, G., Yamakita, Y., Sasaki, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Narumiya, S. und Matsumura, F. (2003). Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Mol. Cell Biol.* 14, 1745-1756.
- Yang, Z. und Watson, J.C. (1993). Molecular cloning and characterization of rho, a ras-related small GTP-binding protein from the garden pea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 8732-8736.

- Yi, S., Chen, J.R., Viallet, J., Schwall, R.H., Nakamura, T. und Tsao, M.S. (1998). Paracrine effects of hepatocyte growth factor/scatter factor on non-small-cell lung carcinoma cell lines. *Br. J. Cancer* 77, 2162-2170.
- Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R.E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima, K. und Matsuda, M. (2003). Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J. Cell Biol.* 162, 223-232.
- Zalcman, G., Closson, V., Camonis, J., Honoré, N., Rousseau-Merck, M.F., Tavitian, A., Olofsson, B. (1996). RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J. Biol. Chem.* 271, 30366-30374.
- Zhang, B. und Zheng, Y. (1998). Regulation of RhoA GTP hydrolysis by the GTPase-activating proteins p190, p50RhoGAP, Bcr, and 3BP-1. *Biochemistry* 37, 5249-5257.
- Zondag, G.C., Evers, E.E., ten Klooster, J.P., Janssen, L., van der Kammen, R.A. und Collard, J.G. (2000). Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 149, 775-782.

Anhang

	$SNR_{\text{Zähler}}$	SNR_{Nenner}	Zählerbild	Nennerbild	Quotientenbild	Mittelwert Quotient
A)	∞	∞	<div>30 30</div> <div>30 30</div>	<div>20 20</div> <div>20 20</div>	<div>1,50 1,50</div> <div>1,50 1,50</div>	$\rightarrow 1,500 \pm 0,000$
B)	10	∞	<div>33 27</div> <div>33 27</div>	<div>20 20</div> <div>20 20</div>	<div>1,65 1,35</div> <div>1,65 1,35</div>	$\rightarrow 1,500 \pm 0,150$
C)	∞	10	<div>30 30</div> <div>30 30</div>	<div>22 22</div> <div>18 18</div>	<div>1,36 1,36</div> <div>1,67 1,67</div>	$\rightarrow 1,515 \pm 0,152$
D)	10	10	<div>33 27</div> <div>33 27</div>	<div>22 22</div> <div>18 18</div>	<div>1,50 1,23</div> <div>1,83 1,50</div>	$\rightarrow 1,515 \pm 0,215$
E)	2	∞	<div>45 15</div> <div>45 15</div>	<div>20 20</div> <div>20 20</div>	<div>2,25 0,75</div> <div>2,25 0,75</div>	$\rightarrow 1,500 \pm 0,750$
F)	∞	2	<div>30 30</div> <div>30 30</div>	<div>30 30</div> <div>10 10</div>	<div>1,00 1,00</div> <div>3,00 3,00</div>	$\rightarrow 2,000 \pm 1,000$
G)	2	2	<div>45 15</div> <div>45 15</div>	<div>30 30</div> <div>10 10</div>	<div>1,50 0,50</div> <div>4,50 1,50</div>	$\rightarrow 2,000 \pm 1,500$

Abbildung A.1: Effekte von Rauschen in Bilddaten auf das Ergebnis ratiometrischer Auswertung. Betrachtet wird ein homogenes Modell-Gesichtsfeld, das aus vier Pixeln besteht. Tritt in einem oder beiden Bildern Rauschen auf, so ändert sich deren mittlere Helligkeit dadurch nicht. Im statistischen Mittel weichen ebenso viele Pixel um den gleichen Betrag nach oben wie nach unten vom realen Wert ab. Enthalten beide Bilder Rauschen, so treten alle Kombinationen von Abweichungen mit gleicher Wahrscheinlichkeit auf. Für einen Pixel, dessen im Zählerbild gemessener Wert nach oben vom realen Wert abweicht, wird der gemessene Wert im Nennerbild demnach in der Hälfte der Fälle ebenfalls nach oben, in der anderen Hälfte der Fälle nach unten vom realen Wert abweichen. Das Rauschen in Bilddaten erhöht die Standardabweichung des ratiometrischen Ergebnisses. Rauschen im Nennerbild, nicht jedoch im Zählerbild, erhöht zudem den Mittelwert des ratiometrischen Ergebnisses. Die Stärke beider Effekte wächst mit sinkendem SNR. Veranschaulichung zu Wang (Wang, 2007).

Tabelle A.1: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten RhoA-Biosensor-Konstrukte.

Konstrukt	Lokalisation	Morphologie	FRET/CFP-Quotientenbilder	
			mittlere Helligkeit	Membranausstülpungen heller als Zellkörper
WT	cytosolisch und membrangebunden, kaum im Zellkern, bevorzugt in Membranausstülpungen	Membranausstülpungen nach HGF	Referenz	+
Q63L	wie WT (laut TIRF in Membranausstülpungen leicht verringert)	wie WT	> WT (nicht immer signifikant)	+
T19N	wie WT, aber geringere Expression, neigt zu granulärer Anhäufung im Zellkörper	weniger Membranausstülpungen	< WT	+
Δ RBD	in Membranausstülpungen etwas verringert	wie WT	< WT	-
Δ RBD-Q63L	in Membranausstülpungen möglicherweise etwas verringert	weniger Membranausstülpungen	< Δ RBD (Unterschied gering)	-
Δ RBD-T19N	wie WT	wie WT, evtl. etwas mehr Membranausstülpungen	< Δ RBD	+
Δ RBD- Δ RhoA	cytosolisch, fast kein Signal aus Membranausstülpungen, hohe Expression	wie WT	> Δ RBD, ungefähr wie WT	-
Δ RBD-R68E	wie WT	wie WT	wie Δ RBD	-
Δ RBD-Q63L-R68E	wie WT (laut TIRF in Membranausstülpungen leicht verringert)	weniger Membranausstülpungen	wie Δ RBD-Q63L	-

(Fortsetzung auf der folgenden Seite)

(Fortsetzung Tabelle A.1)

Konstrukt	Lokalisation	Morphologie	FRET/CFP-Quotientenbilder	
			mittlere Helligkeit	Membranausstülpungen heller als Zellkörper
Δ190-3	cytosolisch, fast kein Signal aus Membranausstülpungen (laut TIRF dennoch teilweise Membranlokalisation)	wie WT	< WT	-
Q63L-Δ190-3	cytosolisch, fast kein Signal aus Membranausstülpungen	wie WT	< Q63L, wie Δ190-3	-
T19N-Δ190-3	cytosolisch, fast kein Signal aus Membranausstülpungen	weniger Membranausstülpungen	< Δ190-3, wie T19N	-
cerul	wie WT	wie WT	< WT	+
cerul-Q63L	wie WT	wie WT	< Q63L, > cerul	+
ΔRBD-cerul	in Membranausstülpungen etwas verringert	wie WT	< ΔRBD, < cerul	-
S188A	wie WT	wie WT	wie WT	+
S188E	wie WT	wie WT	wie WT	+
Q63L-S188A	wie WT	wie WT	wie Q63L	+
Q63L-S188E	wie WT	wie WT	wie Q63L	+
R68E	wie WT	wie WT	wie WT	+
Q63L-R68E	wie WT	wie WT	wie Q63L, nicht > R68E	+
T19N-R68E	wie WT	wie WT	wie T19N, < R68E	+
Raichu-RhoA	in der Zelle wie WT, stark mit ECM assoziiert	wie WT	nicht vergleichbar	+

Tabelle A.2: Optimierung des Zelldichte-Makros für die Phasenkontrast-Zeitraffer-Filme: Die Zelldichten in vier Bildern aus verschiedenen Phasenkontrast-Zeitraffer-Filmen von A549-Zellen wurden manuell sowie mit dem Zelldichte-Makro mit acht verschiedenen Kombinationen von Variablen gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Zelldichten aus den vier Bildern für alle Quantifizierungen wie in Abbildung 4.1 A aufgetragen.

Art der Analyse	P [Pixel]	σ_s [%]	r [Pixel]	bewachsene Fläche [%]
manuell	-	-	-	$52,162 \pm 6,741$
automatisch	250	5,5	3	$53,000 \pm 5,290$
			5	$61,212 \pm 5,141$
		7,5	3	$44,176 \pm 4,494$
			5	$55,153 \pm 5,401$
	350	5,5	3	$53,321 \pm 5,353$
			5	$61,327 \pm 5,152$
		7,5	3	$44,532 \pm 4,582$
			5	$55,420 \pm 5,422$

Tabelle A.3: Ergebnisse der RhoA-Aktivitäts-Pulldowns an HGF-stimulierten A549-Zellen. Verschiedene Proteingehalte von A549-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach HGF-Zugabe; Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Wert ohne HGF-Behandlung. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, teilweise wie in Abbildung 4.4 B aufgetragen.

Zeit nach HGF [min]	aktives RhoA	Anteil aktiven RhoAs	Gesamt- RhoA	α Tubulin	Gesamt- Protein
0	$1,000 \pm 0,000$	$1,000 \pm 0,000$	$1,000 \pm 0,000$	$1,000 \pm 0,000$	$1,000 \pm 0,000$
10	$1,286 \pm 0,136$	$1,732 \pm 0,024$	$0,791 \pm 0,035$	$1,076 \pm 0,104$	$1,113 \pm 0,101$
30	$1,245 \pm 0,067$	$1,901 \pm 0,473$	$0,721 \pm 0,108$	$1,061 \pm 0,120$	$1,133 \pm 0,077$
60	$1,374 \pm 0,164$	$2,239 \pm 0,471$	$0,730 \pm 0,150$	$1,154 \pm 0,138$	$1,192 \pm 0,123$
120	$1,157 \pm 0,156$	$1,559 \pm 0,187$	$0,903 \pm 0,250$	$1,174 \pm 0,147$	$1,141 \pm 0,149$

Tabelle A.4: p190A-Depletion mit fünf verschiedenen Einzel-siRNAs. Verschiedene Protein- und mRNA-Gehalte von A549-Zellen 72 h nach Transfektion mit den spezifizierten siRNAs; Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Wert nach Transfektion mit nt-siRNA. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.5 B aufgetragen.

siRNA	p190A	p190A-mRNA	α Tubulin	Gesamt-Proteingehalt
nt-siRNA	1,000 \pm 0,000	1,000 \pm 0,000	1,000 \pm 0,000	1,000 \pm 0,000
siGRLF1#1	0,191 \pm 0,020	0,310 \pm 0,068	1,393 \pm 0,215	0,921 \pm 0,018
siGRLF1#2	0,195 \pm 0,010	0,408 \pm 0,062	1,639 \pm 0,402	0,859 \pm 0,042
siGRLF1#3	0,174 \pm 0,042	0,399 \pm 0,085	1,741 \pm 0,689	0,808 \pm 0,051
siGRLF1#4	0,160 \pm 0,012	0,313 \pm 0,031	1,240 \pm 0,291	0,903 \pm 0,049
siGRLF1#7	0,250 \pm 0,059	0,400 \pm 0,070	0,853 \pm 0,341	0,948 \pm 0,014

Tabelle A.5: p190A-Depletion mit siGRLF1#1, #4 und deren Mischung. p190-mRNA- und p190A-Gehalte von A549-Zellen nach Transfektion mit unterschiedlichen siRNAs; Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Wert nach Transfektion mit nt-siRNA. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.6 aufgetragen.

siRNA	p190A-mRNA	p190A
nt-siRNA	1,000 \pm 0,000	1,000 \pm 0,000
siGRLF1#1	0,354 \pm 0,036	0,188 \pm 0,075
siGRLF1#4	0,362 \pm 0,062	0,250 \pm 0,116
siGRLF1#1+4	0,388 \pm 0,038	0,277 \pm 0,219

Tabelle A.6: Nachweis der p190A-Depletion zum RhoA-Aktivitäts-Pulldown auf Proteinebene. Relative α Tubulin- und p190A-Gehalte der A549-Zellen, die für den RhoA-Aktivitäts-Pulldown mit den angegebenen siRNAs transfiziert wurden; Daten sind normalisiert auf den jeweiligen Gehalt nach Transfektion mit nt-siRNA.

siRNA	α Tubulin	p190A
nt-siRNA	1,000	1,000
siGRLF1#1+4	0,875	0,261
siGRLF1#1	0,790	0,300
siGRLF1#4	0,826	0,185

Tabelle A.7: Ergebnisse der RhoA-Aktivitäts-Pulldowns an p190A-depletierten, HGF-stimulierten A549-Zellen. Verschiedene Proteingehalte von A549-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach HGF-Zugabe. Die Zellen wurden 72 h zuvor mit den angegebenen siRNAs transfiziert; Daten zu Abbildung 4.8 C sowie ergänzend α Tubulin- und GesamtProtein-Gehalte der Lysate. Werte sind normalisiert auf den jeweiligen Wert der Zellen, die mit derselben siRNA transfiziert, jedoch nicht mit HGF behandelt wurden. Gesamt-Protein-Werte sind sämtlich normalisiert auf den Gesamt-Proteingehalt nt-siRNA-transfizierter Zellen ohne HGF-Behandlung.

siRNA	Zeit nach HGF [min]	aktives RhoA	Anteil aktiven RhoAs	Gesamt-RhoA	α Tubulin	Gesamt-Proteingehalt
nt	0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	10	1,398	1,756	0,762	0,957	1,065
	30	1,332	1,837	0,745	1,028	0,909
	60	1,107	1,367	0,800	0,983	0,927
	120	1,327	1,308	0,833	0,821	0,823
siGRLF1 #1+4	0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,046
	10	1,360	1,299	1,033	0,987	1,125
	30	1,298	1,149	0,979	0,866	1,276
	60	1,186	1,060	0,923	0,825	1,058
	120	1,429	1,094	0,860	0,659	0,927
siGRLF1 #1	0	1,000	1,000	1,000	1,000	0,842
	30	1,257	1,250	1,042	1,037	0,869
siGRLF1 #4	0	1,000	1,000	1,000	1,000	0,735
	30	1,006	0,553	2,010	1,104	0,666

Tabelle A.8: RhoA-Depletion, α Tubulin- und Gesamt-Proteingehalt in nt-siRNA-, siRhoA#6+8-, siRhoA#6- und siRhoA#8-transfizierten A549-Zellen. Werte sind normalisiert auf den jeweiligen Wert nt-siRNA-transfizierter Zellen. Mittelwerte und Standardabweichungen der drei unabhängigen Experimente zur Untersuchung der Zellbewegung nach RhoA-Depletion.

siRNA	RhoA	α Tubulin	Gesamt-Proteingehalt
nt-siRNA	1,000 \pm 0,000	1,000 \pm 0,000	1,000 \pm 0,000
siRhoA#6+8	0,030 \pm 0,020	0,913 \pm 0,200	0,855 \pm 0,031
siRhoA#6	0,031 \pm 0,032	0,684 \pm 0,024	0,801 \pm 0,028
siRhoA#8	0,044 \pm 0,017	0,673 \pm 0,180	0,827 \pm 0,060

Tabelle A.9: Automatisch abgeschätzte Rausch-Kenngrößen incl. Standardabweichungen des verwendeten konfokalen Laser-Raster-Mikroskops. Rausch-Kenngrößen wurden durch das PureDenoise-Makro an 320 Bildern pro Kanal aus zwei unabhängigen Experimenten abgeschätzt.

Kanal	Rausch-Kenngröße		
	A	B	σ_d
CFP	174,116 \pm 23,782	2383,891 \pm 97,673	102,538 \pm 13,531
FRET	123,163 \pm 28,736	2073,063 \pm 32,939	59,706 \pm 9,877

Tabelle A.10: Helligkeiten von CFP-Bildern sowie FRET/CFP- und CFP2/CFP-Quotientenbildern in Abhängigkeit von der verwendeten SNR-Verbesserung. Werte aus 160 Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten. Alle Helligkeiten wurden zunächst auf die entsprechende Helligkeit derselben Zelle ohne vorherige SNR-Verbesserung normalisiert. Mittelwerte dieser normalisierten Helligkeiten sowie deren Standardabweichungen wie in Abbildung 4.14 gezeigt.

SNR-Verbesserung	normalisierte Helligkeit		
	CFP	FRET/CFP	CFP2/CFP
keine	1,000 \pm 0,000	1,000 \pm 0,000	1,000 \pm 0,000
PureDenoise automatisch	0,997 \pm 0,002	0,968 \pm 0,027	0,965 \pm 0,042
PureDenoise manuell	0,997 \pm 0,002	0,969 \pm 0,028	0,965 \pm 0,043
Gauss-Filter mit Radius 0,5 Pixel	0,997 \pm 0,001	0,978 \pm 0,019	0,974 \pm 0,032
Gauss-Filter mit Radius 1,0 Pixel	0,990 \pm 0,003	0,968 \pm 0,028	0,964 \pm 0,043
Gauss-Filter mit Radius 1,5 Pixel	0,983 \pm 0,005	0,967 \pm 0,029	0,962 \pm 0,044
Gauss-Filter mit Radius 2,0 Pixel	0,976 \pm 0,007	0,966 \pm 0,029	0,962 \pm 0,044

Tabelle A.11: Normalisierte Skalierungsfaktoren der Quotientenbilder von MDCK-Zellen, die RhoA-Biosensor-Konstrukte unter verschiedenen Bedingungen exprimieren. Die Zellen exprimierten den funktionellen oder den RBD-trunkierten RhoA-Biosensor in Gegenwart oder Abwesenheit von HGF. Die Skalierungsfaktoren ihrer FRET/CFP-Quotientenbilder wurden auf die Skalierungsfaktoren der entsprechenden CFP2/CFP-Quotientenbilder normalisiert. Die Werte wurden für unmodifizierte Daten erhoben, sowie für die sechs in dieser Arbeit angewandten Varianten der SNR-Verbesserung. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 40 Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.18 gezeigt.

SNR-Verbesserung	normalisierter FRET/CFP-Skalierungsfaktor			
	WT-Biosensor		Δ RBD-Biosensor	
	mit HGF	ohne HGF	mit HGF	ohne HGF
keine	0,933 \pm 0,062	0,919 \pm 0,095	0,896 \pm 0,067	0,991 \pm 0,065
PureDenoise automatisch	1,084 \pm 0,030	1,071 \pm 0,050	1,017 \pm 0,034	1,013 \pm 0,030
PureDenoise manuell	1,073 \pm 0,025	1,062 \pm 0,048	1,014 \pm 0,029	1,011 \pm 0,029
Gauss-Filter, Radius 0,5 px	1,000 \pm 0,046	0,986 \pm 0,069	0,949 \pm 0,049	0,951 \pm 0,045
Gauss-Filter, Radius 1,0 px	1,089 \pm 0,039	1,073 \pm 0,059	1,009 \pm 0,041	1,006 \pm 0,040
Gauss-Filter, Radius 1,5 px	1,119 \pm 0,038	1,104 \pm 0,061	1,032 \pm 0,040	1,025 \pm 0,039
Gauss-Filter, Radius 2,0 px	1,135 \pm 0,037	1,119 \pm 0,063	1,043 \pm 0,040	1,035 \pm 0,039

Tabelle A.12: Mittlere Helligkeiten von FRET/CFP-Quotientenbildern des RhoA-Biosensors. FRET/CFP-Quotientenbilder lebender MDCK-Zellen, die den funktionellen RhoA-Biosensor (WT) oder einen Biosensor mit konstitutiv aktivem RhoA (Q63L) exprimierten. Mittelwert und Standardabweichung für jede Population separat für sechs unabhängige Experimente; 16-20 Zellen pro Experiment und Population wie in Abbildung 4.20 A aufgetragen.

Experiment Nr.	mittlere Helligkeit FRET/CFP-Quotientenbilder	
	WT-Biosensor	Q63L-Biosensor
1	1289,063 ± 171,536	1449,158 ± 152,220
2	1013,350 ± 208,951	1221,300 ± 124,883
3	988,400 ± 269,238	1280,050 ± 157,467
4	1048,263 ± 223,623	1092,600 ± 255,361
5	1294,600 ± 248,145	1437,100 ± 203,342
6	1145,550 ± 230,294	1275,700 ± 197,121

Tabelle A.13: Skalierungsfaktoren der verschiedenen Quotientenbilder einer lebenden MDCK-Zelle, die den RhoA-Biosensor exprimiert. Skalierungsfaktoren der FRET/YFP-, FRET/CFP- und YFP/CFP-Quotientenbilder RhoA-Biosensor-exprimierender Zellen, jeweils normalisiert auf den Skalierungsfaktor des zugehörigen CFP2/CFP-Quotientenbildes. Mittelwerte und Standardabweichungen von 60 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.21 B dargestellt.

Quotientenbild	normalisierter Skalierungsfaktor
FRET/YFP	0,943 ± 0,033
FRET/CFP	1,045 ± 0,045
YFP/CFP	1,064 ± 0,058

Tabelle A.14: RhoA-Biosensor-Konstrukte zeigten viel FRET. Mittlere Lebensdauern vor und nach dem Bleichen von YFP für verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte und CFP-RhoA sowie β -Werte bei intaktem YFP für verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte. Mittlere Lebensdauern sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 (Biosensor-Konstrukte) bzw. 4 (CFP-RhoA) Zellen wie in Abbildung 4.22 B dargestellt. β -Werte sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je 13 (WT- und Q63L-Biosensor) bzw. 11 (Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor) Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.22 C dargestellt.

Konstrukt	Mittlere Lebensdauer [ns]		β bei intaktem YFP
	vor YFP-Bleichen	nach YFP-Bleichen	
WT-Biosensor	1,87111 ± 0,04372	2,37973 ± 0,02956	0,22812 ± 0,01880
Q63L-Biosensor	1,90548 ± 0,08646	2,39276 ± 0,02188	0,22674 ± 0,01973
Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor	1,78145 ± 0,04485	2,35797 ± 0,01890	0,20637 ± 0,01705
CFP-RhoA	2,40978 ± 0,01020	2,40715 ± 0,01174	k. A.

Tabelle A.15: Veränderung der Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder des RhoA-Biosensors durch Trunkierung. Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von WT-, Δ RBD- und Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 70 (Δ RBD- Δ RhoA-Biosensor) bzw. 80 (WT- und Δ RBD-Biosensor) Zellen aus vier unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.24 B dargestellt.

RhoA-Biosensor-Konstrukt	mittlere Helligkeit FRET/CFP-Quotientenbilder
WT	$1483,963 \pm 336,364$
Δ RBD	$1159,950 \pm 249,522$
Δ RBD- Δ RhoA	$1403,200 \pm 401,795$

Tabelle A.16: Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder des RhoA-Biosensors mit konstitutiv aktivem und konstitutiv inaktivem RhoA. Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von WT-, Q63L- und T19N-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 100 Zellen aus fünf unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.25 B dargestellt.

RhoA-Biosensor-Konstrukt	mittlere Helligkeit FRET/CFP-Quotientenbilder
WT	$1098,535 \pm 262,354$
T19N	$896,900 \pm 147,306$
Q63L	$1261,350 \pm 222,409$

Tabelle A.17: Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder RBD-trunkierter Varianten des konstitutiv aktiven und konstitutiv inaktiven RhoA-Biosensors. Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von Δ RBD-, Δ RBD-Q63L- und Δ RBD-T19N-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.26 B dargestellt.

RhoA-Biosensor-Konstrukt	mittlere Helligkeit FRET/CFP-Quotientenbilder
Δ RBD	$976,200 \pm 151,835$
Δ RBD-Q63L	$917,433 \pm 135,850$
Δ RBD-T19N	$807,217 \pm 125,810$

Tabelle A.18: Ergebnisse der RhoA-Biosensor-Pulldowns. Die vier RhoA-Biosensor-Konstrukte WT-, Q63L, Δ RBD- und Δ RBD-A63L-Biosensor wurden jeweils in MDCK- und N2a-Zellen exprimiert und ein RhoA-Aktivitäts-Pulldown durchgeführt. Die Bindungseffizienzen an RBD-Sepharose wurden nach zwei verschiedenen Kriterien verglichen: Für jede Zelllinie wurden jeweils die Konstrukte miteinander verglichen, die sich nur bezüglich der Existenz der Q63L-Mutation im Biosensor-RhoA unterschieden sowie jeweils die Konstrukte, die sich nur bezüglich der Präsenz der RBD im Biosensor unterschieden. Daten wie in Abbildungen 4.27 B und C dargestellt.

Eigenschaft der RhoA-Biosensor-Konstrukte		Zelllinie	Verhältnis der Bindungseffizienzen
zu vergleichen	gemeinsam		
WT : Q63L	RBD	MDCK	1 : 2,412
		N2a	1 : 3,059
	Δ RBD	MDCK	1 : 49,730
		N2a	1 : 3,410
RBD : Δ RBD	WT	MDCK	1 : 42,796
		N2a	1 : 5,074
	Q63L	MDCK	1 : 882,431
		N2a	1 : 5,655

Tabelle A.19: FRET/Donor-Quotientenbilder cerulean-tragender Biosensoren sind dunkler als die ihrer CFP-tragenden Gegenstücke. Helligkeiten der FRET/Donor-Quotientenbilder von WT-, cerulean-, Q63L-, cerulean-Q63L-, Δ RBD- und Δ RBD-cerulean-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.28 dargestellt.

Donor	mittlere Helligkeit FRET/CFP-Quotientenbilder für Biosensor-Konstrukt		
	WT	Q63L	Δ RBD
Cerulean	1050,250 \pm 154,888	1197,050 \pm 119,793	954,900 \pm 117,740
CFP	1283,183 \pm 181,354	1375,200 \pm 179,602	1130,167 \pm 145,075

Tabelle A.20: Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder von RhoA-Biosensor-Konstrukten mit mutierten RhoA-Phosphorylierungsstelle. Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von WT-, S188A-, S188E-, Q63L-, Q63L-S188A- und Q63L-S188E-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 20 (Q63L- und Q63L-S188A-Biosensor: 19) Zellen aus einem Experiment wie in Abbildung 4.29 dargestellt.

Mutation	mittlere Helligkeit FRET/CFP-Quotientenbilder für RhoA	
	WT	Q63L
S188	1231,450 \pm 171,405	1306,789 \pm 136,210
S188A	1221,700 \pm 228,433	1284,684 \pm 262,051
S188E	1171,300 \pm 194,653	1280,200 \pm 204,212

Tabelle A.21: Die R68E-Mutation des Biosensor-RhoAs hatte keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder. Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von WT-, R68E-, Q63L-, Q63L-R68E-, T19N- und T19N-R68E-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.30 dargestellt.

Mutation	mittlere Helligkeit FRET/CFP-Quotientenbilder für RhoA		
	WT	Q63L	T19N
R68	1054,567 ± 236,302	1226,600 ± 174,423	831,917 ± 136,425
R68E	1111,617 ± 193,873	1170,550 ± 214,686	835,367 ± 121,319

Tabelle A.22: Die R68E-Mutation hatte in ΔRBD-Biosensor-Konstrukten keinen Einfluss auf die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder. Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von ΔRBD-, ΔRBD-R68E-, ΔRBD-Q63L- und ΔRBD-Q63L-R68E-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.31 B dargestellt.

Mutation	mittlere Helligkeit FRET/CFP-Quotientenbilder für RhoA-Biosensor	
	ΔRBD	ΔRBD-Q63L
R68	1087,444 ± 228,776	1029,650 ± 174,327
R68E	1148,367 ± 226,277	1052,300 ± 184,561

Tabelle A.23: Die Trunkierung der CAAX-Box im RhoA-Biosensor beeinflusst die Helligkeit der FRET/CFP-Quotientenbilder. Helligkeiten der FRET/CFP-Quotientenbilder von WT-, Δ190-3-, Q63L-, Q63L-Δ190-3-, T19N- und T19N-Δ190-3-Biosensor. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 60 (WT- und Δ190-3-Biosensor: 59) Zellen aus drei unabhängigen Experimenten wie in Abbildung 4.32 B dargestellt.

C-Terminus	mittlere Helligkeit FRET/CFP-Quotientenbilder für Biosensor-RhoA		
	WT	Q63L	T19N
komplett	1164,746 ± 255,276	1268,467 ± 261,300	918,317 ± 154,221
Δ190-3	1068,576 ± 235,025	1049,933 ± 202,916	946,917 ± 192,765

Tabelle A.24: Interne Totalreflexions-Fluoreszenz-Mikroskopie zeigt, dass verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte bei der Membranbindung unterschiedlich stark dynamische Membranausstülpungen bevorzugen. Prozentuale Häufigkeiten der unterschiedlichen Verteilungen an der Membran für verschiedene RhoA-Biosensor-Konstrukte und mCherry-RBD. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten (mCherry-RBD: nur ein Experiment) wie in Abbildung 4.33 B dargestellt.

RhoA-Biosensor-Konstrukt	Lokalisation im Membranausstülpungen im Vergleich zum Zellkörper [%]		
	erhöht	gleich	verringert
mCherry-RBD	66,667 ± 0,000	33,333 ± 0,000	0,000 ± 0,000
WT	81,481 ± 13,858	14,815 ± 10,476	3,704 ± 5,238
Q63L	48,148 ± 13,858	51,852 ± 13,858	0,000 ± 0,000
ΔRBD	38,519 ± 15,852	57,778 ± 12,571	3,704 ± 5,238
ΔRBD-Q63L	66,667 ± 15,713	29,630 ± 18,885	3,704 ± 5,238
ΔRBD-R68E	74,074 ± 10,476	25,926 ± 10,476	0,000 ± 0,000
ΔRBD-Q63L-R68E	44,444 ± 15,713	55,556 ± 15,713	0,000 ± 0,000
Δ190-3	44,444 ± 9,072	22,222 ± 15,713	33,333 ± 18,144
Q63L-Δ190-3	3,703 ± 5,238	51,852 ± 29,163	44,444 ± 24,003

Danksagung

Jetzt ist mal Zeit, „Danke“ zu sagen!

Zuallererst geht ein ganz großer Dank an Prof. Dr. Perihan Nalbant, die sich nicht gescheut hat, mich „fachfremde“ Doktorandin anzunehmen, die diese Arbeit nahezu fünf Jahre lang begleitet hat und dabei trotz aller unerwarteten Ergebnisse immer bereit war, sich Zeit für mich zu nehmen, auch schwierige Gespräche mit Dritten für diese Arbeit zu führen und mir immer wieder Vertrauen in die eigenen Fähigkeiten zuzusprechen.

Ein sehr herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Matthias Gunzer für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen aktuellen und auch ehemaligen Mitarbeitern der AG Nalbant. Ganz besonders gilt mein Dank Melanie Gräßl, Johannes Koch, Manuela Kowalczyk, Olga Müller und Nina Schulze, die mit jeder Menge fachlichen Ratschlägen, unermüdlicher Hilfsbereitschaft in jeder Lebenslage und natürlich mit allem, was fett und glücklich macht, einen unschätzbaren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. Ich weiß jetzt schon, dass ich mir die Zeit mit Euch noch oft zurückwünschen werde! Vielen Dank an Nina und Johannes auch dafür, dass sie dieser Arbeit Priorität eingeräumt haben, als es darum ging, in Rekordzeit Tippfehler und missverständliche Formulierungen auszumerzen! Der Kerngruppe „Genetics and Cell Biology“ der Graduiertenschule BIOME gilt mein Dank für die Möglichkeit, auch andere Forschungsschwerpunkte kennenzulernen und insbesondere auf den jährlichen Treffen auch gute Anregungen für meine eigene Arbeit zu bekommen.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Philippe Bastiaens, in dessen Abteilung am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie ich die FLIM-Messungen durchführen durfte. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch herzlich bei Ola Sabet bedanken, der die direkte Betreuung dieser Arbeiten zufiel und die diese Aufgabe mit großer Freundlichkeit und unerschütterlicher Geduld erfüllt hat.

Ein ganz großer Dank geht an meine Familie! Danke für die interessierten Nachfragen, danke auch für verständnisvolles jetzt-nicht-Nachfragen, für jede Menge moralische Unterstützung und Zuspruch und jederzeit leckeres Essen (was man nicht hoch genug einschätzen kann!).

Der größte Dank gebührt allerdings dem Menschen, der es während dieser Arbeit am meisten mit mir aushalten musste: Meinem Mann Joachim. Vielen Dank für alles, was Du Dir angehört hast, für alles, worin Du mir beständig widersprochen hast, für Deine Geduld, Deine Rücksichtnahme, Deine Fürsorge und Deine starken Nerven. Jeder andere hätte sich an Deiner Stelle vermutlich an den Exorzisten seines Vertrauens gewandt!

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Biologische und methodische Aspekte des komplexen RhoA-Signalnetzwerkes: Sein Einfluss auf die HGF-stimulierte Migration von A549-Zellen und einen FRET-basierten RhoA-Aktivitäts-Biosensor“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Vera Schwarz befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____, _____

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____, _____

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____, _____